

**Molekulare Untersuchungen  
zu Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamase (ESBL)-bildenden Enterobacteriaceae  
als Besiedler und Infektionserreger des Menschen**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Christoph Eller  
aus Halle (Saale)

1. Referent: Prof. Dr. Michael Steinert

2. Referent: PD Dr. Guido Werner

eingereicht am: 28.04.2014

mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.09.2014

Druckjahr 2014

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

**Pfeifer Y, Eller C**

*Current data and trends about the resistance of Gram-negative pathogens to beta-lactams.*

Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz. **2012**; 55(11-12):1405-9.  
doi: 10.1007/s00103-012-1558-4.

**Eller C, Simon S, Miller T, Frick JS, Prager R, Rabsch W, Guerra B, Werner G, Pfeifer Y**

*Presence of  $\beta$ -lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant Salmonella enterica of 30 different serovars in Germany 2005-11.*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **2013**; 68(9):1978-81.

**Leistner R, Meyer E, Gastmeier P, Pfeifer Y, Eller C, Dem P, Schwab F**

*Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive Escherichia Coli. An Exploratory Case-Control Study.*

PLoS One. **2013**; 8(9):e74323.

**Eller C, Leistner R, Guerra B, Fischer J, Wendt C, Rabsch W, Werner G, Pfeifer Y**

*Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany.*

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. **2013**. 69(2): 562-564.

**Pfeifer Y, Eller C, Leistner R, Valenza G, Nickel S, Guerra B, Fischer J, Werner G**

*ESBL-Bildner als Infektionserreger beim Menschen und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir.*

Hygiene und Medizin. **2013**; 38 [7/8]: 294–299

**Haller S\*, Eller C\*, Hermes J, Kaase M, Steglich M, Radonic A, Dabrowski V, Nitsche A, Pfeifer Y, Werne, G, Wunderle W, Abu Sin M, Huppertz HI, Eckmanns T<sup>§</sup>, Nübel U<sup>§</sup>**

*Outbreak of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae on a neonatal intensive care unit in Germany, 2009 to 2012 – evidence for person to person transmission provided by coherent epidemiological and molecular biological results.*

**2014.** in Vorbereitung

<sup>\*</sup>, <sup>§</sup>; Autoren gleichermaßen beteiligt

### **Tagungsbeiträge:**

**Eller C, Steglich M, Haller S, Eckmanns T, Hermes J, Kaase M, Radonic A, Dabrowski W, Nitsche A, Pfeifer Y, Werner G, Nübel U**

*Genome-Based Analysis of the Transmission of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae on a Neonatal Care Unit.*

10<sup>th</sup> International Meeting on Microbial Epidemiological Markers (IMMEM), Paris. **2013**

**Eller C, Pfeifer Y, Leistner R, Valenza G, Wendt C, Werner G**

*Extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and (fluoro)quinolone resistance in Escherichia coli from hospitals, the ambulatory setting and the community.*

23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin.

**2013**

**Eller C, Leistner R, Wendt C, Guerra B, Fischer J, Werner G, Pfeifer Y**

*Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany.*

23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID), Berlin.

**2013**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorveröffentlichungen der Dissertation .....</b>	<b>I</b>
<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Summary .....</b>	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Antibiotikaklassen und ihre Wirkmechanismen .....	2
1.2 Resistenzmechanismen gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika .....	4
1.3 Entwicklung der Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamasen (ESBL).....	5
1.4 AmpC- $\beta$ -Laktamasen .....	7
1.5 Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen .....	9
1.6 CTX-M als erfolgreicher Global Player .....	10
1.7 Plasmide als Verbreitungsvektor für Resistenzgene.....	12
1.8 Nosokomiale Infektionen mit Gram-negativen Erregern .....	13
1.9 $\beta$ -Laktamase-Bildner im veterinärmedizinischen Bereich und ihre putative zoonotische Bedeutung .....	14
1.10 Ganzgenom-Sequenzierung als epidemiologisches Werkzeug.....	14
1.11 Durchgeführte Studien und Zielstellung dieser Arbeit .....	15
1.11.1 Molekulare Charakterisierung von ambulanten und nosokomialen ESBL- produzierenden <i>E. coli</i> in Deutschland .....	15
1.11.2 Molekulare Charakterisierung ESBL-produzierender <i>E. coli</i> aus einer Fall- Kontroll-Studie des Charité-Universitätsklinikums Berlin.....	16
1.11.3 Untersuchungen von $\beta$ -Laktamasen in Cephalosporin-resistenten <i>Salmonella</i> <i>enterica</i> in Deutschland 2005-2011 .....	17
1.11.4 Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland .....	17
1.11.5 Untersuchung des Ausbruchs ESBL-produzierender <i>K. pneumoniae</i> auf einer neonatologischen Intensivstation .....	18
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Materialien.....	19

2.1.1	Geräte .....	19
2.1.2	Chemikalien.....	20
2.1.3	Chemotherapeutika .....	21
2.1.4	Kits.....	22
2.1.5	Medien und Standardlösungen.....	22
2.1.6	PCR-Primer .....	23
2.1.7	Software und Online-Ressourcen .....	25
2.1.8	Sequenzierplattformen .....	26
2.1.9	Verwendete Bakterienisolate .....	26
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden .....	26
2.2.1.1	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung .....	26
2.2.1.2	Extraktion von DNA für PCR-Analysen.....	27
2.2.1.3	Extraktion von genomischer DNA für die Ganzgenomsequenzierung .....	27
2.2.1.4	Extraktion von plasmidischer DNA .....	27
2.2.1.5	Pulsfeld-Gelelektrophorese .....	28
2.2.1.6	Southern Blot und Hybridisierung .....	30
2.2.1.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.1.8	Multilocus sequence typing (MLST) .....	33
2.2.1.9	Bestimmung der phylogenetischen Gruppe von <i>E. coli</i> .....	33
2.2.1.10	PCR-basierte Plasmid-Replikontypisierung .....	34
2.2.1.11	Plasmid Multilocus sequence typing (pMLST).....	34
2.2.1.12	Plasmid Restriktionsfragment-Längenanalyse (Plasmid-RFLP) .....	34
2.2.1.13	Konjugationsexperimente .....	34
2.2.1.14	Sequenziermethoden .....	35
2.2.1.15	Identifikation von $\beta$ -Laktamase-Genen .....	39
2.2.2	Bioinformatische Methoden .....	40
2.2.2.1	Sequenzierungsstrategie .....	40
2.2.2.2	<i>De novo</i> -Sequenzierung eines <i>K. pneumoniae</i> ST514 Referenzgenoms .....	40
2.2.2.3	<i>De novo</i> -Sequenzierung des Plasmid-Genoms des Referenzstammes .....	41
2.2.2.4	Mapping der Illumina Sequenz-Reads und Identifizierung von Punkmutationen.....	41

2.2.2.5	Behandlung repetitiver Sequenzabschnitte und mobiler genetischer Elemente .....	42
2.2.2.6	Detektion von Prophagensequenzen .....	42
2.2.2.7	Detektion und Behandlung von Rekombination .....	42
2.2.2.8	Detektion homoplasischer Punktmutationen .....	43
2.2.2.9	Einordnung von ST514 in die Populationsstruktur von <i>K. pneumoniae</i> .....	43
2.2.3	Phylogenetische Analyse des <i>K. pneumoniae</i> -Ausbruchs .....	43
2.2.3.1	Rekonstruktion eines Maximum Likelihood-Stammbaumes .....	43
2.2.3.2	Berechnung von Substitutionsrate und Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr .....	43
2.2.3.3	Analyse der Übertragungswege während des Ausbruchgeschehens .....	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1	Charakterisierung ambulanter und nosokomialer ESBL-produzierender <i>E. coli</i> aus dem Limbach Laborverbund .....	46
3.1.1	Allgemeine Charakterisierung der ambulanten ESBL- <i>E. coli</i> -Isolate .....	46
3.1.2	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung .....	48
3.1.3	Molekulare Charakterisierung der ambulanten <i>E. coli</i> -Isolate der Limbach-Laborstudie .....	49
3.1.4	Allgemeine Charakterisierung der nosokomialen ESBL- <i>E. coli</i> -Isolate .....	51
3.1.5	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung .....	53
3.1.6	Molekulare Charakterisierung der nosokomialen <i>E. coli</i> -Isolate der Limbach-Laborstudie .....	54
3.2	Charakterisierung ESBL-produzierender ambulanter <i>E. coli</i> aus einer Fall-Kontroll-Studie des Charité Universitätsklinikum Berlin .....	57
3.2.1	Allgemeine Charakterisierung der Studienisolate .....	57
3.2.2	Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung .....	58
3.2.3	Molekulare Charakterisierung .....	59
3.3	Untersuchungen von $\beta$ -Laktamase-Bildung in Cephalosporin-resistenten <i>Salmonella enterica</i> in Deutschland 2005-2011 .....	62
3.3.1	Resistenz-Charakterisierung .....	62
3.3.2	Molekulare Charakterisierung .....	64
3.3.3	Gehäuftes Auftreten verschiedener <i>Salmonella</i> Serovare und Vergleich mit veterinärmedizinischen Isolaten .....	65

3.4	Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland .....	68
3.4.1	Allgemeine Charakterisierung.....	68
3.4.2	Antimikrobielle Empfindlichkeiten .....	69
3.4.3	Resistenzgene und Plasmide.....	70
3.5	Untersuchung des Ausbruchs ESBL-produzierender <i>K. pneumoniae</i> auf einer neonatologischen Intensivstation.....	73
3.5.1	Ausbruchsverlauf .....	73
3.5.2	Auswahl der Isolate für die Ganzgenom-Sequenzierung.....	74
3.5.3	Charakterisierung des Ausbruchsstammes.....	76
3.5.4	<i>De novo</i> -Sequenzierung des Ausbruchsstammes und Resequenzierung der ausbruchassoziierten Isolate.....	77
3.5.5	Plasmide des Referenzstammes .....	78
3.5.6	Mobile genetische Elemente im Chromosom .....	80
3.5.7	Nukleotidpolymorphismen innerhalb des Ausbruchs .....	80
3.5.8	Genetische Populationsstruktur .....	81
3.5.9	Genetische Diversität von <i>K. pneumoniae</i> innerhalb einzelner Patienten.....	83
3.5.10	Evolutionsrate und Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr .....	84
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>86</b>
4.1	Charakterisierung ESBL-produzierender Enterobacteriaceae in Deutschland .....	86
4.1.1	Limbach-Laborstudie: ESBL-Genotypen in den ESBL- <i>E. coli</i> -Isolaten aus dem Krankenhaus und dem ambulanten Bereich .....	86
4.1.2	Fall-Kontrollstudie der Charité Berlin .....	90
4.1.3	Untersuchungen von $\beta$ -Laktamasen in Cephalosporin-resistenten <i>Salmonella enterica</i> in Deutschland 2005-2011 .....	91
4.1.4	Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland .....	93
4.1.5	ESBL und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir .....	94
4.2	Untersuchung eines Ausbruchs ESBL-produzierender <i>K. pneumoniae</i> auf einer neonatologischen Intensivstation.....	97
4.2.1	Charakterisierung des Ausbruchsstammes.....	97



---

4.2.2	Genetische Verwandtschaft der <i>K. pneumoniae</i> Ausbruchsisolate und Bestätigung des Ausbruches .....	98
4.2.3	Evolutionsrate des Ausbruchsstammes und Datierung des Ausbruchs .....	98
4.2.4	Transmissions-Modus und Pathogen-Reservoir .....	99
4.2.5	Analyse von Umgebungsisolaten .....	101
4.2.6	Genetische Diversität des Ausbruchs-Klons innerhalb einzelner Patienten ....	101
4.2.7	Fazit .....	102
4.3	Ausblick .....	103
<b>Referenzen</b> .....		X
<b>Anhang I:</b> Bakterielle Isolate .....		XXVIII
<b>Anhang II:</b> Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) .....		XXXVII
<b>Anhang III:</b> Nukleotidpolymorphismen.....		XLIV
<b>Anhang IV:</b> Coverage-Werte der <i>K. Pneumoniae</i> -Genome .....		XLVI
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....		XLVII
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....		XLIX
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....		LI
<b>Danksagung</b> .....		LIV
<b>Lebenslauf</b> .....		LV

## Zusammenfassung

Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamase (ESBL)-produzierende Enterobacteriaceae stellen ein wachsendes Problem für die Gesundheitsversorgung dar. Die durch die ESBL-Produktion verursachte Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Antibiotika schränkt die therapeutischen Optionen gegen diese Erreger drastisch ein. Problematisch ist dabei die Lokalisation der ESBL-kodierenden Gene auf mobilen genetischen Elementen. Dies begünstigt deren inter- und intraspezifischen Austausch innerhalb der Enterobacteriaceae. Insbesondere ESBL-bildende *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* zeigen neben ihrer  $\beta$ -Laktam-Resistenz auch Resistenzen gegen andere Antibiotikaklassen und stellen somit eine ernstzunehmende Gefahr in Krankenhäusern sowie dem ambulanten Bereich dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 84 ESBL-*E. coli*-Isolate von ambulanten Patienten aus einer Fall-Kontroll-Studie des Charité Universitätsklinikums Berlin, 231 ESBL-*E. coli*-Isolate aus Krankenhäusern sowie dem ambulanten Bereich und 150 ESBL-produzierende *Salmonella enterica*-Isolate aus Stuhlproben molekular charakterisiert. Anhand dieser Daten konnte die ESBL-Typen-Verteilung in den verschiedenen Bereichen beschrieben und die Gruppe der CTX-M-Enzyme mit den ESBL-Typen CTX-M-15 und CTX-M-1 als dominanteste ESBL-Familie in *E. coli* bestätigt werden. Die Analyse der Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten *S. enterica* zeigte als häufigsten ESBL-Typ CTX-M-1, welcher regelmäßig auch aus Enterobacteriaceae-Isolaten aus Nutztieren und Fleischprodukten isoliert wird. Zusätzlich konnte der weltweit seltene ESBL-Typ CTX-M-8 in sieben klinischen Enterobacteriaceae-Isolaten sowie einem *Salmonella*-Isolat aus Hackfleisch detektiert werden. Dabei war das *bla*<sub>CTX-M-8</sub> auf einander ähnlichen Plasmiden lokalisiert. Diese Ergebnisse unterstützen die bereits postulierte Theorie der Transmission von ESBL-produzierenden Bakterien und/oder Resistenzplasmiden vom Nutztier auf den Menschen.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit ein Ausbruch ESBL-produzierender *K. pneumoniae* mittels Ganzgenom-Sequenzierung aufgearbeitet. Es konnte ein 3,4 Mb großes Referenzgenom sequenziert und eine Gesamtzahl von 61 Nukleotidpolymorphismen (SNPs) innerhalb aller Ausbruchs isolate identifiziert werden. Unter Verwendung Bayes'scher Analysemethoden wurde eine Evolutionsrate für den Ausbruchsstamm so wie der Zeitpunkt des Beginns des Ausbruches kalkuliert. Basierend auf der genetischen Variabilität der Ausbruchs isolate konnte eine Patient-Patient-Transmission als Verbreitungsmodus postuliert und ein potentiell es Reservoir des Ausbruchsstammes in langzeitkolonisierten Patienten identifiziert werden. Die gewonnen Daten verdeutlichen den wichtigen Beitrag, den die Genom-Sequenzierung zu detaillierten epidemiologischen Analysen leisten kann.

## Summary

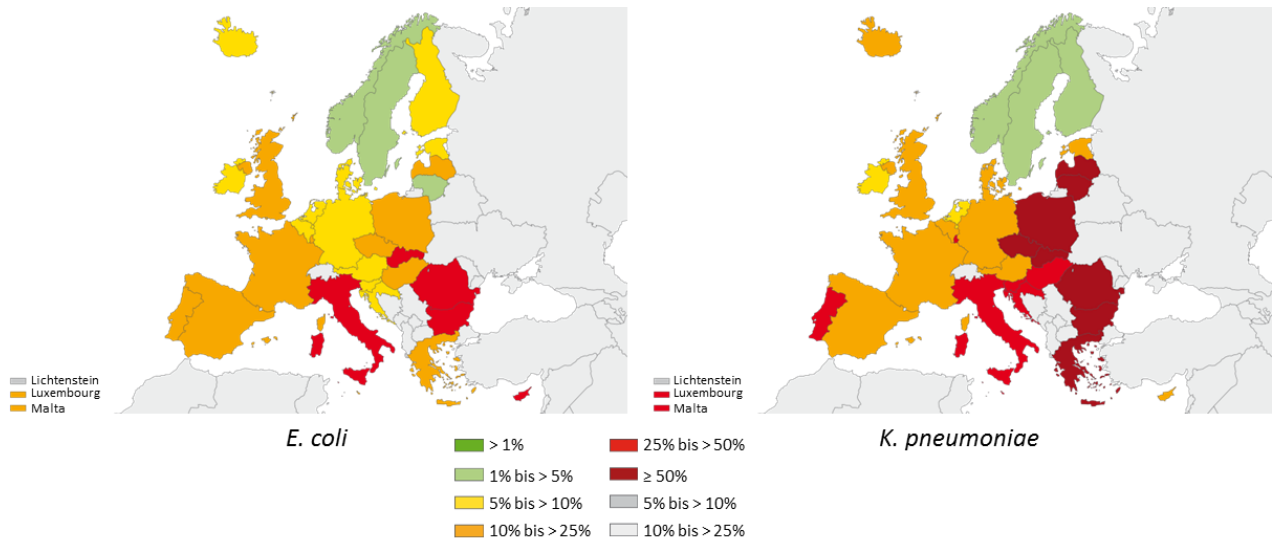
The production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) in clinical Enterobacteriaceae causes serious problems in health care settings. Since ESBL-producing pathogens are often multidrug resistant therapeutic options are limited. ESBL-coding genes are often located on mobile genetic elements allowing their inter- and intraspecific transmission among Enterobacteriaceae. ESBL-producing bacteria like *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are a growing threat in hospitals and the ambulant setting as they frequently show resistances to other antimicrobial agents besides  $\beta$ -lactam antibiotics.

In this thesis 84 community-acquired *E. coli* isolates from a case-control study by the Charité University Hospital Berlin, 231 ESBL-*E. coli* from German hospitals and outpatient departments, as well as 150 *Salmonella enterica* from stool samples were characterised to compare ESBL type distribution in the different settings. The group of CTX-M enzymes could be identified as the dominant ESBL-group and CTX-M-15 and CTX-M-1 as the most prevalent ESBLs in *E. coli* in hospitals as well as in the outpatient setting. Analysis of the 3rd generation cephalosporin-resistant *S. enterica* revealed CTX-M-1 as the dominant ESBL-type in *Salmonella*. The same type is frequently detected in studies on ESBL-producing *E. coli* and *Salmonella* from livestock and the food chain. Additionally, the rare CTX-M-8-ESBL could be identified on similar plasmids in seven clinical Enterobacteriaceae Isolates from different species and a food sample. These findings again support the already postulated transmission of ESBL-producing bacteria and/or resistance plasmids from livestock to humans.

Furthermore, an outbreak of ESBL-producing *K. pneumoniae* on a neonatal ward in a German hospital could be further elucidated using whole genome sequencing. A reference genome consisting of a 5.4 Mb chromosome and a supposed plasmid were reconstructed. Comparing the core genomes of all sequenced isolates a total number of 61 single nucleotide polymorphisms (SNPs) were detected. Using a Bayesian approach, the evolutionary rate for the *K. pneumoniae* outbreak strain was calculated and the beginning of the outbreak could be deduced. Based on their genetic diversity the relatedness of the outbreak isolates was analysed and a putative patient-to-patient transmission was detected. Also a potential reservoir of the outbreak strain in long term colonized patients could be predicted. The produced data show the important contribution of whole genome sequencing towards sophisticated and more detailed epidemiological analysis.

## 1 Einleitung

Im Laufe der vergangenen Jahre konnte in Deutschland ein stetiger Anstieg von Infektionen und Kolonisationen mit  $\beta$ -Laktam-resistenten Gram-negativen Bakterien beobachtet werden. Während die Zahl der Infektionen mit Gram-positiven Bakterien, wie z.B. Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), konstant blieb bzw. sogar leicht abnahm (<https://ars.rki.de>, Abfrage: 09.04.2014), erlangten speziell Enterobakterien wie *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* mit Resistenzen gegen Dritt- und Viertgenerations-Cephalosporine (Ceftazidim, Cefotaxim, Cefepim) mehr und mehr an Bedeutung. So zeigen Daten aus der Antibiotikaresistenz-Surveillance-Studie der Paul-Ehrlich-Gesellschaft im Zeitraum von 2001 bis 2010 einen Anstieg der Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz in *E. coli* von 2,6 % auf 17,4 %. Im Fall von *K. pneumoniae* ist im selben Zeitraum ein Resistenz-Anstieg von 9,7 % auf 16,9 % zu verzeichnen ([www.p-e-g.org](http://www.p-e-g.org); Abfrage 09.04.2014). Die Resistenzdaten aus dem am Robert Koch-Institut (RKI) angesiedelten Antibiotikaresistenz-Surveillance-System ARS bestätigen ebenfalls den Anstieg der Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz bei Enterobakterien, insbesondere *E. coli* und *K. pneumoniae*, im Zeitraum 2008 bis 2012. Dieser Trend ist sowohl im stationären als auch im ambulanten Bereich zu erkennen. So stieg die Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz in *E. coli* innerhalb von vier Jahren von 7 % auf 11,6 % in der stationären und von 3 % auf 6,5 % in der ambulanten Versorgung. In *K. pneumoniae* kam es zu einem Anstieg von 10,6 % auf 13,1 % in der stationären und von 3,2 % auf 8,5 % in der ambulanten Versorgung (<https://ars.rki.de>, Abfrage: 09.04.2014). Daten aus dem europäischen Surveillance-System EARS-Net ([www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)) zeigen, basierend auf enterobakteriellen Isolaten aus Blutkulturen, ein besorgniserregendes Bild (Abbildung 1.1). Zwar liegt Deutschland im Bezug auf Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz im europäischen Mittelfeld, jedoch sind in einigen europäischen Ländern 25-50 % der *E. coli*- und mehr als 50 % der *K. pneumoniae*-Stämme gegen Drittgenerations-Cephalosporine resistent. Obwohl sich die verschiedenen Surveillance-Systeme hinsichtlich einbezogener Isolate und Testmethoden unterscheiden, ist der Trend der ansteigenden Resistenz unverkennbar.



**Abbildung 1.1:** Anteil invasiver *E. coli* und *K. pneumoniae* mit Resistenzen gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen in Europa 2012; Quelle: EARS-Net-Datenbank, [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu)

## 1.1 Antibiotikaklassen und ihre Wirkmechanismen

Seit der Entdeckung des Penicillins im Jahr 1929 [1] wurden durch die Erforschung neuer Drug Targets und die molekulare Modifizierung von Wirkstoffen verschiedene weitere, effektivere antibiotische Substanzen entdeckt und entwickelt. Antibiotika lassen sich in die Klasse der Zelltod-induzierenden Substanzen (Bakterizide) und die der Zellwachstum-inhibierenden Substanzen (Bakteriostatika) einteilen. Die verschiedenen Antibiotikaklassen haben dabei unterschiedliche Angriffspunkte im bakteriellen Zellstoffwechsel, wie die Zellwandsynthese, die DNA-Replikation oder die ribosomale Proteinbiosynthese.

Die Chinolone sind Derivate der Nalidixinsäure, welche erstmals in den 1960er Jahren zur Behandlung von Harnwegsinfekten eingesetzt wurde [2]. Nalidixinsäure und andere Chinolone der ersten Generation werden heute, aufgrund ihrer Toxizität kaum noch verwendet [3]. Heutzutage sind Zweit-, Dritt- und Viertgenerations-Chinolone, wie Ciprofloxacin, Levofloxacin oder Moxifloxacin gebräuchlicher [4]. Die Chinolone stoppen durch ihre Bindung die DNA-Gyrase und die Topoisomerase IV in der bakteriellen DNA-Replikation am Punkt der DNA-Strang-Aufspaltung. Dabei kommt es zu einer Immobilisierung der Replikationsgabel, was die getrennten DNA-Stränge von der Wiedervereinigung abhält. Dies führt zur Bakteriostasis und letztendlich zum Zelltod [5, 6].

Substanzen, deren Wirkung auf einer Hemmung der Proteinbiosynthese an den Ribosomen beruht, bilden die größte Antibiotikagruppe. Diese lassen sich in 50s- und 30s-Inhibitoren einteilen. Die Gruppe der bakteriostatischen Tetracykline (z.B. Oxytetracyclin) bindet an die 30s Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und blockiert damit den Zugang der Aminoacyl-tRNA zum Ribosom. Dadurch kommt es zu einem Stopp der Proteinelongation [4]. Die Klasse der Aminoglycoside (z.B. Gentamicin, Kanamycin) zeichnet sich durch eine ähnliche Wirkungsweise aus. Jedoch verursachen diese Substanzen eine Misstranslation durch den Einbau falscher Aminosäuren in der Proteinelongation, was zu einer bakteriziden Wirkung beiträgt [7]. Die Gruppe der 50s-Inhibitoren beinhaltet die Antibiotikaklassen der Phenicole (z.B. Chloramphenicol), Macrolide (z.B. Erythromycin), Lincosamide (z.B. Clindamycin), Streptogramine (z.B. Dalfopristin) und Oxazolidinone (z.B. Linezolid). Diese Antibiotika binden an die 50s Untereinheit der bakteriellen Ribosomen und blockieren die Peptidyltransferase-Reaktion, womit die Knüpfung Peptidbindung und wiederum die Proteinelongation verhindert wird [4].

Antibiotika aus der Gruppe der  $\beta$ -Laktame (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme) greifen in die bakterielle Zellwandsynthese ein. Diese Substanzen blockieren die, durch die Transpeptidasen (Penicillin-Bindeproteine, PBP) katalysierte, Verbindung der Peptidoglycan-Untereinheiten. Diese Blockierung wird durch ein Anlagern des  $\beta$ -Laktams an das aktive Zentrum des PBP erreicht. Das  $\beta$ -Laktam-Molekül besitzt aufgrund seines reaktiven  $\beta$ -Laktam-Rings eine analoge Struktur zum terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Dipeptid des Peptidoglycan. Damit dient es als Substrat/Inhibitor für die PBPs und es kommt zur Bildung eines sog. Penicilloyl-Enzym-Komplex, der die Transpeptidase irreversibel inaktiviert und somit die Vernetzung von N-Acetylmuraminsäure und N-Acetylglucosamin verhindert [8].  $\beta$ -Laktame sind also besonders in der Wachstumsphase der Bakterien wirksam. Häufig werden  $\beta$ -Laktam-Antibiotika gemeinsam mit  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren, wie Clavulansäure, Tazobactam oder Sulbactam, verabreicht. Diese Substanzen ähneln in ihrer Struktur den  $\beta$ -Laktam-Antibiotika und können von  $\beta$ -Laktamasen irreversibel gebunden werden, wodurch das Enzym inaktiviert wird [9].

Zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Gram-negativen Bakterien wird heutzutage wieder vermehrt das vor mehr als 40 Jahren entdeckte Fosfomycin verwendet [10, 11]. Dieses, von Streptomyceten produzierte Antibiotikum, verhindert den ersten Schritt

der Peptidoglycan-Biosynthese im Cytosol. Fosfomycin bindet dabei an die UDP-N-Acetylglucosamin-Enolpyruvyl-Transferase (MurA) und verhindert damit die Synthese der N-Acetylmuraminsäure, einem Vorläufer des Peptidoglycan [12].

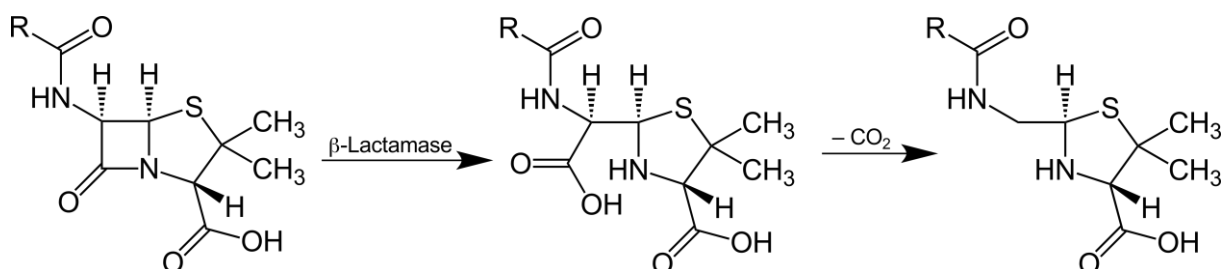
Weiterhin bekannt ist, dass die Drug-Target-Interaktionen von Aminoglycosiden (mit Ribosomen), Chinolonen (mit der DNA-Gyrase) und  $\beta$ -Laktamen (mit den PBPs) die Oxidation von NADH über die Zitratzyklus-abhängige Elektronentransportkette stimulieren. Damit wird die Bildung von Superoxid-Radikalen angeregt, welche Eisen-Schwefel-Cluster schädigen und dadurch freies Eisen verfügbar machen. Dieses kann durch die Fenton-Reaktion oxidiert werden, wodurch Hydroxyl-Radikale entstehen. Diese tragen wiederum zur Zerstörung von DNA, Proteinen sowie Lipiden bei, welche zum Tod der Bakterienzelle führt. Die primären Effekte der Antibiotika gemeinsam mit den produzierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) induzieren zusätzlich eine zelluläre Stressantwort, die zur Einleitung apoptotischer Prozesse führt [13, 14].

## 1.2 Resistenzmechanismen gegenüber $\beta$ -Laktam-Antibiotika

Der vermehrte Einsatz der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu Beginn der 1960er Jahre führte zur Selektion verschiedener Resistenzmechanismen gegenüber dieser Antibiotikaklasse. Die Kombination verschiedener Mechanismen kann ihre Resistenzwirkung erhöhen und auch ihr Wirkspektrum erweitern. Es existieren drei Hauptmechanismen, welche zu einer Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamen führen. Eine davon ist die strukturelle Veränderung der Penicillin-Bindeproteine, dem Angriffspunkt der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika. Diese, durch Punktmutationen in den entsprechenden Genen, hervorgerufenen Modifikationen haben eine drastische Abnahme der Bindungsaffinität gegenüber  $\beta$ -Laktamen zur Folge [15]. Ein prominentes Beispiel hierfür ist die Expression des PBP2a in *S. aureus*. Dieses alternative, durch das *mecA*-Gen kodierte, PBP vermittelt im Methicillin-resistenten *S. aureus* (MRSA) eine Resistenz gegenüber allen Penicillinen, Cephalosporinen und Carbapenemen [16, 17]. Alternative PBPs sind ebenso aus Enterokokken, *Streptococcus pneumoniae*, Neisserien und anderen Pathogenen bekannt [18]. Ein weiterer Mechanismus der  $\beta$ -Laktam-Resistenz ist die aus *Pseudomonas aeruginosa* bekannte Expression von Efflux-Pumpen, wie dem MexA-MexB-OprM-System [19]. Diese können, neben anderen Antibiotika,  $\beta$ -Laktame als Substrat verwenden und diese aus der Zelle aktiv wieder nach außen schleusen. Hinzu kommt in *P. aeruginosa* eine durch Mutationen verringerte Membranpermeabilität, welche das

Eindringen des Antibiotikums in die Zelle zusätzlich erschwert [20, 21]. In einigen Enterobacteriaceae, wie *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* und *E. coli*, resultiert ein solcher mutationsbedingter Porinverlust in einer Resistenz gegenüber Carbapenemen [9].

Eine in Gram-negativen Bakterien weit verbreitete Strategie der  $\beta$ -Laktam-Resistenz ist die Produktion von  $\beta$ -Laktamasen. Diese Enzyme werden in den periplasmatischen Raum abgegeben und sind in der Lage den  $\beta$ -Laktam-Ring der  $\beta$ -Laktam-Antibiotika zu hydrolysieren (Abbildung 1.2). Einige Spezies, wie *K. pneumoniae* [22], *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *P. aeruginosa* produzieren eigene chromosomal kodierte  $\beta$ -Laktamasen, die entweder dauerhaft exprimiert werden oder induzierbar sind [23]. Diese ursprünglichen  $\beta$ -Laktamasen weisen ein recht enges Wirkspektrum auf, jedoch wurden mit dem Einsatz der Breitspektrum-Antibiotika immer neue  $\beta$ -Laktamasen mit erweitertem Wirkspektrum identifiziert. Die heute bedeutendste Klasse der  $\beta$ -Laktamasen ist die der ESBL (Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamasen). Diese Enzyme sind in der Lage auch Cephalosporin-Antibiotika der dritten und vierten Generation zu hydrolysieren, sind jedoch durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren hemmbar.



**Abbildung 1.2: Hydrolytische Öffnung des Laktam-Rings von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika durch  $\beta$ -Laktamasen;**  
Quelle: www.wikipedia.org

### 1.3 Entwicklung der Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamasen (ESBL)

Mit der Entwicklung der Breitspektrum-Penicilline und deren weitreichender Verwendung zur Behandlung bakterieller Infektionen in den 1960er Jahren traten nach und nach immer mehr Bakterienstämme auf, die resistent gegen diese Antibiotika waren. Bald darauf wurden  $\beta$ -Laktamasen, den Laktam-Ring der Penicilline hydrolysierende Enzyme, als Ursache für diese Resistenz identifiziert. Richmond und Sykes klassifizierten diese  $\beta$ -Laktamasen anhand ihres Hydrolysespektrums und ihrer Hemmbarkeit durch p-Chlormercuribenzoessäure und



Cloxacillin [24]. Die erste entdeckte plasmidvermittelte  $\beta$ -Laktamase TEM-1 wurde 1965 von Datta & Kontomichalou beschrieben [25]. TEM-1 und die in geringerem Maße vorkommenden  $\beta$ -Laktamasen TEM-2 und SHV-1 wurden in den folgenden Jahren zu einer maßgeblichen Ursache für die Resistenz gegen Breitspektrum-Penicilline [26]. Bis in die frühen 1970er Jahre hatte sich TEM-1 in 30-50 % aller *E. coli*-Isolate und auch in andere Enterobacteriaceae verbreitet [27].

Alle TEM-Varianten sind bisher nur als erworbene, auf mobilen genetischen Elementen kodierte Enzyme gefunden worden [27, 28]. Ein Organismus, dessen Genom als Herkunft dieses  $\beta$ -Laktamase-Typs in Frage kommt, konnte bisher jedoch nicht identifiziert werden. Als Ursprung der  $\beta$ -Laktamasen der SHV-Familie konnte 2004 eine chromosomale  $\beta$ -Laktamase von *K. pneumoniae* identifiziert werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Vorläufer der SHV-Familie durch mindestens zwei Mobilisierungsereignisse mittels des mobilen genetischen Elements IS26 aus dem Chromosom von *K. pneumoniae* hervorgegangen ist [22].

Die Verbreitung dieser plasmidkodierten Enzyme in verschiedenen enterobakteriellen Spezies erforderte ab Mitte der 1970er die Entwicklung von  $\beta$ -Laktam-Antibiotika die gegen diese  $\beta$ -Laktamasen unempfindlich waren. Aus diesen Bemühungen gingen unter anderem die Oxyimino-Cephalosporine (z.B. Cefuroxim, Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon) hervor, welche durch chemische Modifikation vor der Hydrolyse durch klassische  $\beta$ -Laktamasen geschützt waren. Diese Antibiotika wurden aufgrund ihres breiten Wirkspektrums, ihrer niedrigen Kosten und ihrer unkomplizierten Anwendbarkeit zum Standard-Therapiemittel bei Harnwegsinfektionen, Pneumonien und gastrointestinalen Infektionen [29].

Diese extensive Verwendung führte schnell zur Selektion von Resistenzen gegen diese Antibiotikaklasse, welche sich zuerst in der, durch Mutation hervorgerufenen, Überexpression von chromosomalen AmpC- $\beta$ -Laktamasen in *Enterobacter* ssp., *Citrobacter* ssp. und *Serratia* ssp. zeigten [30, 31]. Im Jahr 1982 wurde in Deutschland von Kliebe *et al.* die SHV-Variante SHV-2 in *Klebsiella ozeanae* identifiziert, welche eine Resistenz gegen Oxyimino-Cephalosporine vermittelt [32]. Neben TEM-3 [33, 34] wurden in den folgenden Jahren immer mehr Enzyme entdeckt, die zur Hydrolyse der Oxyimino-Cephalosporine im Stande waren und durch Punktmutation entstandene Varianten von TEM- und SHV-Typen darstellten [29]. Der Begriff der Extended-Spektrum  $\beta$ -Laktamasen

oder ESBL wurde zuerst um 1989 erwähnt [35]. Die ESBL wurden von Bush *et al.* [36] als Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen klassifiziert, welche Penicilline, Oxyimino-Cephalosporine und Monobactame spalten und eine Hemmbarkeit durch Clavulansäure aufweisen.

Ebenfalls im Jahr 1989 wurde in Frankreich und Deutschland erstmals eine weitere plasmidkodierte ESBL-Familie in *E. coli* beschrieben, die der CTX-M- $\beta$ -Laktamasen [37, 38]. Diese Gruppe zeigt kaum genetische Verwandtschaft mit den TEM und SHV-ESBLs und besitzt eine hohe hydrolytische Aktivität gegen Cefotaxim. Ihre genetischen Ursprünge hat die Familie der CTX-M-ESBL in den chromosomalen  $\beta$ -Laktamasen verschiedener Spezies der Gattung *Kluyvera* [39-43] aus denen sie im Zuge mehrerer Mobilisierungsereignisse hervorgegangen sind [44]. Bis zum heutigen Tag sind in der Datenbank der Lahey Clinic in Burlington, USA, welche das Nomenklaturregister für  $\beta$ -Laktamasen führt, 183 Varianten des SHV-Typs, 217 Varianten des TEM-Typs sowie 150 Varianten des CTX-M-Typs zu finden (<http://www.lahey.org/Studies/>; Abfrage: 18.04.2014).

Neben den ESBL der TEM-, SHV- und CTX-M-Familien, welche weltweit am häufigsten zu finden sind, sind die Gruppen der VEB-, PER- und GES-ESBL zu nennen. Der VEB-Typ (VEB-1) wurde zum ersten Mal 1996 auf einem Plasmid eines *E. coli*-Stammes in Vietnam beschrieben. Wie die zuvor genannten ESBL der CTX-M-Familie zeigt VEB-1 eine hohe hydrolytische Aktivität gegen Breitspektrum-Cephalosporine mit Ausnahme von Ceftazidim und Aztreonam, jedoch ist die Aktivität gegenüber Penicillinen deutlich geringer [45]. ESBL der VEB-Familie zeigen nur eine geringe genetische Verwandtschaft zu anderen Klasse-A-ESBL (< 38 % Aminosäuresequenz-Identität). Signifikante Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz konnten zu den  $\beta$ -Laktamasen CBLA aus *Bacteroides uniformis* [46] und CEPA aus *Bacteroides fragilis* [47] gefunden werden. Die Gruppe der PER-ESBL wurde zum ersten Mal 1993 in *P. aeruginosa* in Frankreich beschrieben. Das *P. aeruginosa*-Isolat stammte dabei aus einem Patienten, welcher aus einem Krankenhaus in Ankara, Türkei nach Frankreich verlegt wurde [48].

## 1.4 AmpC- $\beta$ -Laktamasen

Neben den ESBL sind AmpC- $\beta$ -Laktamasen (Ambler-Klasse C, BJM-Klasse 1) eine häufige Ursache für Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz in Enterobacteriaceae. Im Gegensatz zu den ESBL sind Enzyme dieser Klasse nicht durch  $\beta$ -Laktamase-Inhibitoren hemmbar. AmpC- $\beta$ -Laktamasen hydrolysieren Oxyimino- und 7- $\alpha$ -methoxy-Cephalosporine (Cefoxitin)

sowie Monobactame. Sie vermitteln somit eine Resistenz gegenüber allen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, außer Cefepim, Cefpiron und Carbapenemen [49]. Viele enterobakterielle Spezies, wie *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp. oder *Aeromonas* spp., besitzen eigene chromosomal kodierte AmpC- $\beta$ -Laktamasen. Die Expression dieser Enzyme ist in vielen Genera induzierbar oder wird durch eine Promotormutation konstitutiv aktiviert [50, 51]. 1998 wurde die erste plasmidvermittelte AmpC-Variante CMY-1 beschrieben [52]. Neben den bis zum heutigen Tag bekannten 119 CMY-Typen (<http://www.lahey.org/Studies/>; Abfrage: 18.04.2014), sind zusätzlich auch weitere AmpC-artige Enzyme, wie ACC, ACT, DHA, FOX, MIR und MOX innerhalb der Enterobacteriaceae verbreitet.

## 1.5 Klassifizierung von $\beta$ -Laktamasen

Kurz nach ihrer Entdeckung gab es mehrere Versuche der Klassifikation der  $\beta$ -Laktamasen [24, 53-55]. Die heute gebräuchlichsten Systeme sind die Klassifikation nach Ambler (Tabelle 1.1) [56] und die Einteilung nach Bush, Jacoby und Medeiros (Tabelle 1.2) [36, 57]. Im System nach Ambler werden die  $\beta$ -Laktamasen anhand ihrer Aminosäuresequenz eingeteilt. Die Gruppen A, C und D bilden die Serin- $\beta$ -Laktamasen, welche einen Seryl-Rest im aktiven Zentrum besitzen. Im Gegensatz zu diesen wird bei den Metallo- $\beta$ -Laktamasen der Gruppe B eine Hydrolyse des  $\beta$ -Laktams durch ein Zinkion im aktiven Zentrum katalysiert. Unter den  $\beta$ -Laktamasen der Gruppe A befinden sich die im Vorangegangenen beschriebenen Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen und ESBL der Familien TEM, SHV und CTX-M. Ebenfalls in der Gruppe A findet man die Carbapenemasen der KPC-Familie, welche eine hydrolytische Aktivität gegenüber der Antibiotikaklasse der Carbapeneme aufweisen [57]. Die ESBL der OXA-Familie befinden sich aufgrund ihrer nur entfernt verwandten Aminosäuresequenz in Gruppe D.

**Tabelle 1.1: Schema zur Klassifikation von  $\beta$ -Laktamasen nach Ambler;** adaptiert nach Pfeifer 2010 [58]

	$\beta$ -Laktamase-Klasse	$\beta$ -Laktamasen	Beispiele	Relevante Spezies	Resistenzen
Serin- $\beta$ -Laktamasen	<b>A</b>	Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11	Enterobacteriaceae und Nonfermenter	Ampicillin, Cephalotin
		ESBL TEM	TEM-3, TEM-52		Penicilline
		ESBL SHV	SHV-5, SHV-12		3. Gen. Cephalosporine
		ESBL CTX-M	CTX-M-15, CTX-M-1		Aztreonam
		Carbapenemasen	KPC		alle $\beta$ -Laktame
	<b>C</b>	Cephamecinasen chromosomal kodiert	AmpC	<i>Enterobacter</i> ssp. <i>Citrobacter</i> spp.	Cephamecine (Cefoxitin), 3. Gen. Cephalosporine
		Cephamecinasen Plasmid-kodiert	CMY, DHA, FOX, ACC		Cephamecine (Cefoxitin), 3. Gen. Cephalosporine
	<b>D</b>	Breitspektrum- $\beta$ -Laktamasen	OXA-1, OXA-9	Enterobacteriaceae	Oxacillin, Ampicillin, Cephalotin
		ESBL OXA	OXA-2, OXA-10		3. Gen. Cephalosporine
		Carbapenemasen	OXA-48*, OXA-23, OXA-24, OXA-58	Enterobacteriaceae <i>A. baumannii</i>	alle $\beta$ -Laktame
Metallo- $\beta$ -Laktamasen	<b>B</b>	Metallo- $\beta$ -Laktamasen	VIM, IMP, NDM	Enterobacteriaceae und Nonfermenter	$\beta$ -Laktame (außer Aztreonam)

\*vermittelt keine Resistenz gegenüber Zweit-/Drittgenerations-Cephalosporinen

Das Klassifikationsschema nach Bush, Jacoby und Medeiros [36, 57] benutzt anstatt der molekularen Struktur der  $\beta$ -Laktamasen, also deren Aminosäuresequenz, das

Substratspektrum und die Hemmbarkeit durch Clavulansäure bzw. Tazobactam und EDTA zu deren Einteilung. Hierdurch kann die Gruppenzugehörigkeit besser mit dem Phänotyp klinischer Isolate korreliert werden. In dieser Klasseneinteilung befinden sich die ESBL in Gruppe 2be während AmpC-Enzyme Gruppe 1 zugeordnet werden.

**Tabelle 1.2: Schema zur Klassifikation von  $\beta$ -Laktamasen nach Bush, Jakoby und Medeiros [36, 57]**

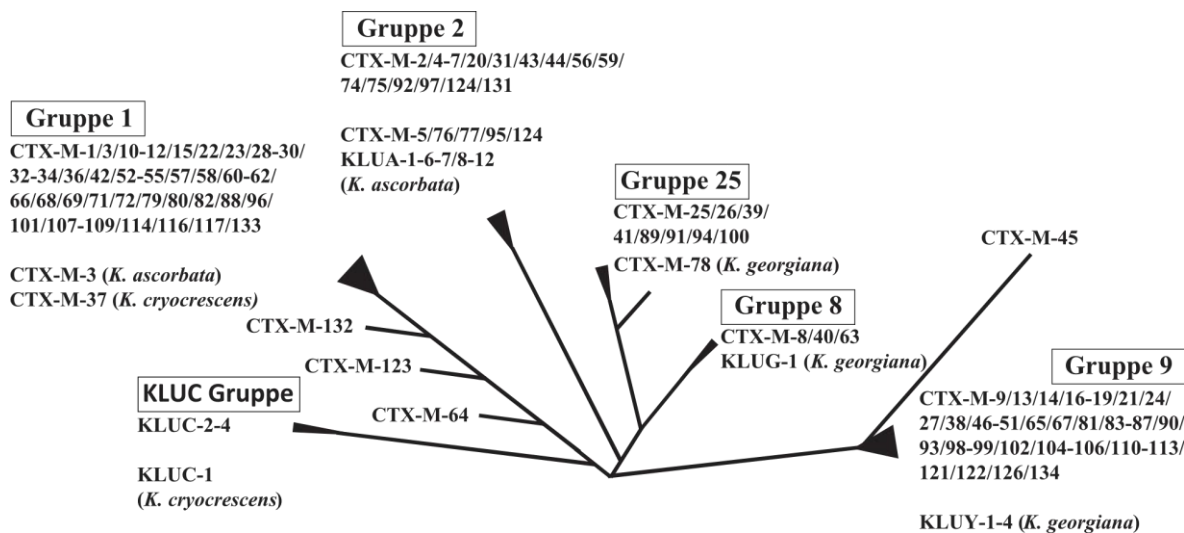
Gruppe nach BJM <sup>1</sup>	Klasse nach Ambler	Substrate	Hemmbarkeit		Repräsentative Vertreter
			CA/TZB <sup>2</sup>	EDTA	
1	C	Cephalosporine	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cephalosporine	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilline	+	-	PCI
2b	A	Penicilline, frühe Cephalosporine	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilline, Cefalosporine, Extended-Spektrum-Cephalosporine, Monobactame	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penicilline	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Penicilline, Cephalosporine, Extended-Spektrum-Cephalosporine, Monobactame	-	-	TEM-50
2c	A	Carbencillin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbencilline, Cefepim	+	-	RTG-4
2d	D	Cloxacillin	+/-	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Extended-Spektrum-Cephalosporine	+/-	-	OXA-11, Oxa-15
2df	D	Carbapeneme	+/-	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Extended-Spektrum-Cephalosporine	+	-	Induzierbare Cephalosporinasen aus <i>Proteus vulgaris</i> CepA
2f	A	Carbapeneme	+/-	-	KPC-2, IMI-1, NMC-A aus <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 aus <i>Serratia marcescens</i>
3a	B	Carbapeneme	-	+	L1 aus <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA aus <i>Bacteroides fragilis</i> , MP-1, VIM-1, IND-1
3b	B	Carbapeneme	-	-	CphA, Sfh-1

<sup>1</sup>BJM, Bush, Jakoby, Medeiros; <sup>2</sup>CA, Clavulansäure; TZB, Tazobactam

## 1.6 CTX-M als erfolgreicher Global Player

Phylogenetisch lassen sich die CTX-M-Enzyme in fünf Hauptgruppen einteilen (Abbildung 1.3). Anders als bei anderen ESBLs ist die ursprüngliche Herkunft der CTX-M-Gruppen weitestgehend geklärt. Homologe der *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene wurden in verschiedenen Spezies des Genus *Kluyvera* gefunden, einem Mitglied der Familie der Enterobacteriaceae, welches kaum

mit humanen Infektionen in Verbindung gebracht wird [59, 60]. Die *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene sind meist mit Insertionssequenzen, wie *ISEcpI* oder *ISCR1* assoziiert [61], welche die Mobilisierung aus dem *Kluyvera* spp.-Genom und den Transfer auf Plasmide vermittelt haben [62].



**Abbildung 1.3: Genetische Verwandtschaft der CTX-M-Gruppen auf Basis ihrer Aminosäuresequenz;** nach D'Andrea *et al.* 2013 [60]; Die Kladen zeigen die gruppenzugehörigen CTX-M-Typen sowie die putativen Vorläufer aus *Kluyvera* spp., Dreiecke an den Enden einiger Äste zeigen Allelvarianten an, wobei die Größe der Dreiecke die Zahl der Varianten repräsentiert.

Bereits um das Jahr 2000 - in Polen und Spanien früher, in Frankreich und Großbritannien später - konnte ein dramatischer Umschwung im Verhalten ESBL-produzierender Enterobacteriaceae beobachtet werden. Zuvor kamen ESBLs (TEM und SHV) meist in nosokomialen *Klebsiella* spp.- oder *Enterobacter* spp.-Isolaten von Intensivstationen vor [63]. CTX-M-produzierende Enterobacteriaceae waren allgemein, bis auf einige wenige Ausbrüche in Osteuropa, selten [64]. Heute bietet sich jedoch ein völlig anderes Bild und Enzyme des CTX-M-Typs sind die weltweit dominanten ESBLs mit deutlich höheren Prävalenzen in *E. coli* aus ambulanten und nosokomialen Infektionen [63, 65]. Verschiedene Studien zur Darmbesiedelung gesunder Personen zeigten weiterhin, dass CTX-M-produzierende Enterobakterien auch innerhalb der gesunden Allgemeinbevölkerung weit verbreitet sind [66-68].

Der überragende Ausbreitungserfolg dieser Enzymklasse ist mehreren Faktoren geschuldet. Zum einen sind *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene meist auf sehr mobilen genetischen Plattformen, wie

Transposons und Plasmiden, lokalisiert [69]. Zum anderen sind die Träger dieser Resistenzgene häufig sehr erfolgreiche Enterobacteriaceae-Stämme, wie der weltweit verbreitete *E. coli* O25b-ST131 [70]. Ein weiterer Grund ist die in CTX-M-produzierenden Organismen häufige Co-Resistenz gegenüber Aminoglykosiden und Fluorchinolonen. Diese wird häufig von Resistenzgenen verursacht, welche auf denselben Plasmiden bzw. innerhalb derselben mobilen genetischen Strukturen lokalisiert sind [71].

## 1.7 Plasmide als Verbreitungsvektor für Resistenzgene

Die Verbreitung von Antibiotikaresistenz-Genen wird maßgeblich vom plasmidvermittelten inter- und intraspezifischen Gentransfer beeinflusst. Durch die Aufnahme mobiler genetischer Elemente, wie Insertionssequenzen und Transposons tragen Plasmide zur Verbreitung von Resistenz-Genen bei. Derartige Resistenz-Plasmide sind meist über 50 kb groß und können Resistenzen gegenüber verschiedenen Antibiotika-Klassen inkl.  $\beta$ -Laktamen, Aminoglykosiden, Tetrazyklinen, Chloramphenicol, Sulfonamiden, Trimethoprim, Makroliden und Chinolonen vermitteln [72]. Häufig sind dabei gekoppelte genetische Resistenz-Determinanten auf einem Plasmid lokalisiert [73].

Der minimale Anteil eines Plasmids, der sich mit der individuellen Anzahl von Kopien selbst repliziert, wird als Replikon bezeichnet. Replikons kodieren den Replikationsursprung (*ori*) und spezifische Replikations-Initiator-Proteine [74]. Als Plasmid-Inkompatibilität bezeichnet man das Phänomen, dass keine zwei Plasmide desselben Replikon-Typs in derselben Zelle koexistieren können. Diese Inkompatibilität basiert auf der Sequenzhomologie der Replikations-Kontrollsysteme, d.h. zwei Plasmide welche dieselben Kontrollsysteme besitzen sind inkompatibel [75]. Neben den Systemen zur autonomen Replikation können Plasmide Toxin-Antitoxin-Systeme tragen, die während der bakteriellen Zellteilung den Zelltod von Tochterzellen verursachen, welche keine entsprechende Plasmidkopie enthalten [76]. Die Systeme zur stabilen Erhaltung der Plasmide unterstützen deren Verbreitung, bieten jedoch keinen selektiven Vorteil für die Wirtszelle.

ESBLs der CTX-M-Familie, speziell die Variante CTX-M-15, sind weltweit in hoher Zahl verbreitet. Dabei ist das *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-Gen häufig gemeinsam mit *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> und der plasmidvermittelten Chinolon-Resistenz-Determinante *aac(6')-Ib-cr* auf Plasmiden der Inkompatibilitätsgruppe IncF kodiert. Diese Plasmide sind meist Multi-Replikon-Plasmide mit

Größen von 50 bis 200 kb. Das *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Gen ist hingegen meist auf IncI1- und IncN-Plasmiden lokalisiert [72].

## 1.8 Nosokomiale Infektionen mit Gram-negativen Erregern

Als nosokomial wird eine Infektion bezeichnet, die bei Aufnahme ins Krankenhaus weder vorhanden, noch in der Inkubationsphase war. Generell gilt hier ein Zeitfenster von 48 Stunden. Das heißt, eine Infektion die später als 48 Stunden nach einem stationären Aufenthalt auftritt, gilt als nosokomial. Hierbei wird zwischen exogenen und endogenen Infektionen unterschieden. Bei exogenen Infektionen werden Erreger direkt aus der Umgebung aufgenommen (z.B. Personenkontakt, Infusionen, Katheter). Endogene Infektionen werden in primäre und sekundäre Infektionen unterschieden. Bei primären endogenen Infektionen ist der Infektionserreger Teil der Normalflora des Patienten. Derartige Infektionen treten vor allem bei Patienten mit behandlungsbedingt eingeschränktem Immunsystem auf. Im Falle von sekundären endogenen Infektionen wird der Erreger erst im Laufe des Krankenhausaufenthaltes Teil der Patientenflora und verursacht erst auf dieser Basis Infektionen [77].

Postoperative Wundinfektionen (24,3 %), Harnwegsinfektionen (23,2 %) sowie Infektionen der unteren Atemwege (21,7 %) sind die in Deutschland am häufigsten auftretenden nosokomialen Infektionen [78]. Hierbei gehören *S. aureus* (21,3 %) und Gram-negative Bakterien, wie *P. aeruginosa* (18,1 %), *Klebsiella spp.* (12,6 %), *E. coli* (11,7 %) und *Enterobacter spp.* (8,6 %) zu den häufigsten Erregern [79]. Besondere Beachtung verlangt die hohe Zahl Drittgenerations-Cephalosporin-resistenter Enterobacteriaceae. So lässt sich anhand der Daten der SARI-Studie (Surveillance der Antibiotika-Anwendung und der bakteriellen Resistenz auf Intensivstationen) zwischen 2001 und 2009 ein Anstieg der Zahl Drittgenerations-Cephalosporin-resistenter *E. coli* und *K. pneumoniae* auf deutschen Intensivstationen von 1,2 % auf 11,0 % bzw. von 3,8 % auf 12,5 % feststellen. Zudem sind Infektionen mit Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten Erregern im Vergleich zu empfindlichen Erregern mit einer 21 % höheren Letalität assoziiert und führen zu einem verlängerten Krankenhausaufenthalt sowie gesteigerten Behandlungskosten [80].

*E. coli* ist weltweit, ambulant wie nosokomial, einer der häufigsten Erreger von Infektionen des Urogenital- sowie Gastrointestinaltraktes. Deshalb kommt ihm bei der Verbreitung von ESBLs im Krankenhaus, aber auch im ambulanten Bereich, besondere Bedeutung zu [81].



*K. pneumoniae* gehört mit 6,7 % und 10,1 % zu den fünf häufigsten Erregern einer bakteriellen Sepsis bzw. einer nosokomialen Pneumonie [82]. Weiterhin sind Antibiotika-resistente *K. pneumoniae* prominente Verursacher nosokomialer Ausbrüche. Diese Ausbrüche betreffen oft Risikogruppen, wie z.B. Neugeborene und können aufgrund der eingeschränkten Behandlungsoptionen einen verheerenden Verlauf haben [83-85].

### **1.9 $\beta$ -Laktamase-Bildner im veterinärmedizinischen Bereich und ihre putative zoonotische Bedeutung**

Das Vorkommen von ESBLs ist jedoch nicht nur auf den humanmedizinischen Bereich begrenzt. Jüngste Studien belegen europaweit das Vorkommen ESBL-produzierender Enterobacteriaceae in Nutztieren (Schweine, Rinder, Geflügel), Haustieren und auch in Fleischprodukten [86-89]. Der im humanen Bereich weltweit dominierende ESBL-Typ CTX-M-15 [65, 90] ist im veterinären Bereich deutlich weniger verbreitet. In Europa ist CTX-M-15 regelmäßig mit Haustieren (15 %) sowie Schweinen und Rindern (8 %) assoziiert. Ansonsten sind in den unterschiedlichen Tiergruppen verschiedene Verteilungsmuster zu erkennen. So sind die ESBL CTX-M-1 und die AmpC- $\beta$ -Laktamase CMY-2 in *E. coli* aus Geflügel vorherrschend. In *E. coli* aus Schweinen und Rindern ist hingegen CTX-M-1 mit Anteilen von bis zu 72 % dominant [86].

Verschiedene Studien an ESBL-produzierenden Bakterien verdeutlichen die Existenz einer Schnittmenge an ESBL-Typen und Plasmiden im humanen und veterinärmedizinischen Bereich. So wird das in tierischen Enterobacteriaceae-Isolaten häufig detektierte CTX-M-1 auch in menschlichen Isolaten von *E. coli* mit großer Häufigkeit detektiert. [68, 91-93]. In einer holländischen Studie konnten 2011 in Menschen und Geflügel die gleichen CTX-M-1-kodierenden Plasmide in *E. coli* nachgewiesen werden [87]. Eine Übertragung ESBL-produzierender Bakterien vom Tier auf den Menschen ist also durchaus denkbar, ein endgültiger Beweis hierfür konnte jedoch noch nicht erbracht werden.

### **1.10 Ganzgenom-Sequenzierung als epidemiologisches Werkzeug**

Nosokomiale Ausbrüche sind gerade im Fall der multiresistenten Gram-negativen Bakterien ein wachsendes Problem. Im Falle einer Häufung von Infektionen in einem Krankenhaus gilt es schnellstmöglich einen eventuellen Ausbruch zu identifizieren und Transmissionswege zwischen Patienten, aber auch zwischen Patienten und Krankenhauspersonal, auszumachen

und einzudämmen. Weiterhin hat die Identifikation einer etwaigen Streuquelle höchste Priorität. Hierzu ist es nötig die genetische Verwandtschaft der Erregerstämme sehr detailliert zu analysieren. Häufig werden DNA-Makrorestriktions-Analysen und Multi Locus Sequence Typing (MLST) zur Untersuchung der genetischen Verwandtschaft von bakteriellen Isolaten aus Ausbruchsszenarios verwendet. Jedoch ist deren Auflösungsvermögen im Falle lokaler, zeitlich begrenzter Ausbruchsgeschehen stark eingeschränkt. Dort dominieren klonale Stammvarianten, die eine sehr nahe genetische Verwandtschaft aufweisen [94-96]. Aussagen über den räumlichen und zeitlichen Verlauf eines lokalen Ausbruches sind mit diesen Methoden im Detail nicht möglich. Durch die rasante Entwicklung auf dem Gebiet der DNA-Sequenzierung bietet sich ein Werkzeug, welches eine phylogenetische Analyse mit deutlich höherer Auflösung ermöglicht. Dies wurde bereits an ausgewählten Studien demonstriert. So konnten Harris *et al.* mittels der Analyse von Ganzgenomdaten, im Rahmen eines MRSA-Ausbruches auf einer Kinderstation eines englischen Krankenhauses, nachweisen, dass die MRSA-Kolonisation innerhalb des Personals die Persistenz des Ausbruchsstammes auf der Station ermöglichte [97]. Nübel *et al.* untersuchten einen MRSA-Ausbruch auf einer deutschen neonatologischen Intensivstation. Dort konnten durch Genomsequenzierungen Transmissionswege und die mögliche Existenz unentdeckter MRSA-Fälle innerhalb der Station aufgedeckt werden [98]. Weiterhin konnten Snitkin *et al.* auf Basis von epidemiologischen Daten sowie Genomsequenzen ein Transmissionsnetzwerk innerhalb eines Ausbruchs von *K. pneumoniae* nachverfolgen [99]. Gardy *et al.* und Török *et al.* konnten mittels Ganzgenomvergleichen tiefgehende Einsichten in die Dynamik von Tuberkulose-Ausbrüchen erlangen [100, 101].

## **1.11 Durchgeführte Studien und Zielstellungen dieser Arbeit**

### **1.11.1 Molekulare Charakterisierung von ambulanten und nosokomialen ESBL-produzierenden *E. coli* in Deutschland**

Im Rahmen einer prospektiven Studie in Zusammenarbeit mit dem Limbach Laborverbund wurden von 29 mikrobiologischen Diagnostiklaboren im Zeitraum von Januar 2010 bis Oktober 2012 126 nosokomiale und 105 ambulante ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate gesammelt. Diese wurden von den jeweiligen Laboren bereits positiv auf eine Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen (Cefotaxim und/oder Ceftazidim) mit Hemmbarkeit durch Clavulansäure getestet. Die entsprechenden Isolate wurden

anschließend an das Robert Koch-Institut Wernigerode versandt und mittels PCR und Sanger-Sequenzierung auf das Vorhandensein entsprechender ESBL-Gene getestet. Weiterhin wurde mittels PCR auf Gene der plasmidvermittelten Chinolon-Resistenzen (PMQR) getestet. Dazu zählen die *qnr*-Varianten *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* und *qnrS*, welche Schutzpeptide der DNA-Gyrase kodieren sowie das Gen *aac(6')Ib-cr*, was eine Methyltransferase kodiert, die eine Methylierung von Chinolonen bewirkt [102]. Zur Feststellung einer genetischen Verwandtschaft wurden zudem die phylogenetischen Gruppen der *E. coli*-Isolate bestimmt. Ziel dieser Studie war die Ermittlung der Prävalenz der einzelnen ESBL-Typen, sowie deren phylogenetischen Stammhintergrund im Bereich der ambulanten und stationären Versorgung über das gesamte Bundesgebiet. Des Weiteren wurde der Vergleich von ambulanter und nosokomialer ESBL-Verteilung angestrebt.

### **1.11.2 Molekulare Charakterisierung ESBL-produzierender *E. coli* aus einer Fall-Kontroll-Studie des Charité-Universitätsklinikums Berlin**

Im Zuge einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie des Instituts für Hygiene und Umweltmedizin des Charité-Universitätsklinikums Berlin wurden 84 ambulant erworbene ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate molekular charakterisiert. Ziel der Studienautoren war eine Risikofaktor-Analyse für den Erwerb einer ambulanten Kolonisation mit ESBL-bildenden *E. coli*. Die Isolate stammten von Patienten, welche zwischen Mai 2011 und Januar 2012 in das Charité-Universitätsklinikum aufgenommen wurden. Die Probenentnahme erfolgte innerhalb der ersten 72 Stunden nach Aufnahme des Patienten um die Wahrscheinlichkeit des Erwerbs eines ESBL-produzierenden *E. coli* aus der Klinik möglichst gering zu halten. Die Identifikation der ESBL-produzierenden Isolate geschah mittels Testung auf Resistenz gegenüber Cefotaxim und/oder Ceftazidim und Hemmbarkeit durch Clavulansäure. Die Isolate wurden aus Rektalabstrichen und Urin gewonnen. Proben von Patienten, welche in den 12 Monaten vor ihrer Aufnahme hospitalisiert waren, wurden ausgeschlossen. Ziel dieser Studie war die Analyse der ESBL-Typen-Verteilung sowie des phylogenetischen Stammhintergrundes. Weiterhin sollten die ermittelten Daten mit den Ergebnissen der Analyse der ESBL-*E. coli* aus dem ambulanten Bereich des Limbach-Laborverbundes verglichen werden.

### **1.11.3 Untersuchungen von $\beta$ -Laktamasen in Cephalosporin-resistenten *Salmonella enterica* in Deutschland 2005-2011**

Aus der Stammsammlung des Nationalen Referenzzentrums (NRZ) für Salmonellen und andere Enteritis-Erreger in Wernigerode wurden insgesamt 150 *Salmonella enterica*-Isolate verschiedener Serovare aus den Jahren 2005-2011 identifiziert, welche eine Resistenz gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen (Cefotaxim und/oder Ceftazidim) aufwiesen. Durch das NRZ wurden bereits die Phagen-Typisierung sowie die Serotypie der *Salmonella*-Isolate durchgeführt. Die 150 Isolate wurden mittels PCR und Sequenzierung auf das Vorhandensein von ESBL- und AmpC- $\beta$ -Laktamasen sowie PMQR-Genen hin analysiert. Des Weiteren erfolgte für ausgewählte Isolate (z.B. bei Verdacht eines Ausbruches oder Häufungen von Isolaten bestimmter Serovare in einem Jahr/über mehrere Jahre) eine Untersuchung der genetischen Verwandtschaft mittels *Xba*I-Makrorestriktion und Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE). Die Daten ausgewählter Isolate wurden anschließend mit denen von *Salmonella*-Isolaten aus Nutztieren verglichen, die den gleichen ESBL-/AmpC-Genotyp aufwiesen und im selben Jahr isoliert wurden (Einsendung und Kooperation mit dem Bundesinstitut für Risikobewertung BfR).

### **1.11.4 Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland**

Im Rahmen der im Vorfeld beschriebenen Studien, sowie in den ESBL-Routineuntersuchungen des Robert Koch-Institutes in Wernigerode, wurden acht Enterobacteriaceae-Isolate der Spezies *E. coli*, *S. enterica* und *E. aerogenes* identifiziert, welche die seltene  $\beta$ -Laktamase CTX-M-8 produzieren. Bei CTX-M-8 handelt es sich um einen bis dato in Deutschland noch nicht beschriebenen ESBL-Typ. In *S. enterica* ist dieser  $\beta$ -Laktamase-Typ generell noch nicht beschrieben worden. In dieser Studie wurden die CTX-M-8-produzierenden Isolate hinsichtlich ihrer antimikrobiellen Empfindlichkeiten getestet und ESBL- sowie PMQR-Gene mittels PCR und Sanger-Sequenzierung überprüft. Die identifizierten *S. enterica*-Isolate wurden nach dem White-Kauffmann-Le Minor-Schema serotypisiert. Des Weiteren wurden die gefundenen *E. coli*-Stämme mittels *Xba*I-Makrorestriktion und PFGE auf etwaige phylogenetische Verwandtschaftsverhältnisse analysiert und die Übertragbarkeit der *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Resistenzplasmide in Konjugationsexperimenten überprüft. Diese Plasmide wurden außerdem mittels Plasmid-MLST und S1-PFGE typisiert.

---

### **1.11.5 Untersuchung des Ausbruchs ESBL-produzierender *K. pneumoniae* auf einer neonatologischen Intensivstation**

Im Zeitraum von November 2011 bis Februar 2012 war die damalige Fachgruppe 32 des Robert Koch-Institutes in Berlin an der Untersuchung eines Ausbruchs ESBL-produzierender *K. pneumoniae* auf der neonatologischen Intensivstation des Klinikums Bremen-Mitte beteiligt. Zum Zeitpunkt der Involvierung des RKI im November 2011 waren 17 Neugeborene mit dem *K. pneumoniae*-Ausbruchsstamm kolonisiert oder infiziert und drei davon waren bereits verstorben [104]. Im Zuge der Untersuchungen dieses Ausbruches wurden *K. pneumoniae*-Isolate von 37 Patienten gesammelt. Diese Isolate wurden im Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum mittels Makrorestriktions- und MLST-Analysen als Ausbruchs isolate bestätigt und als CTX-M-15-produzierender *K. pneumoniae*-Stamm des Sequenztyp ST514 identifiziert.

In dieser Arbeit wurden die Genome einer Stammsammlung aus 46 dieser Ausbruchs isolate (Patientenisolate und Umweltisolate) unter Verwendung verschiedener Technologien sequenziert. Aus den generierten Daten sollten, unter Verwendung phylogenetischer Methoden, Erkenntnisse über die genetische Verwandtschaft der Ausbruchs isolate, den zeitlichen Verlauf des Ausbruchsgeschehens sowie Transmissionswege des Erregers erlangt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

In Tabelle 2.1 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte mit deren Herstellern aufgelistet.

**Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und deren Hersteller**

Gerät	Hersteller
Autoklav, Biomedis	H+P Labortechnik
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Elektrophoresespannungsquelle PowerPack Basic	Bio-Rad Laboratories
Geldokumentation GeldDoc XRS	Bio-Rad Laboratories
Inkubator HERAcool	Thermo Scientific Inc.
Inkubator Heraeus Instruments	Kendro Laboratory Products GmbH
Kühlschrank (-20 °C) LIEBHERR comfort	Liebherr-holding GmbH
Kühlschrank (-4 °C)	Siemens AG
Kühlzentrifuge Bioguge 28 RS	Heraeus GmbH
Mikrowelle Severin	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Multipipette Reasearch pro	Eppendorf AG
pH-Meter, HANNA instruments	neolab GmbH
Pipetten Reference variabel	Eppendorf AG
Plattformschüttler Heidolph Polymax 1040	neolab GmbH
Pulsfeldgelelektrophorese Buffer Drain Tube	Bio-Rad Laboratories
Pulsfeldgelelektrophorese CHEF-DRIII System	Bio-Rad Laboratories
Pulsfeldgelelektrophorese Cooling Module	Bio-Rad Laboratories
Pulsfeldgelelektrophorese Variable Speed Pump	Bio-Rad Laboratories
Reinstwasser Destillationssystem	SG Reinstwasser GmbH
Spectrophotometer Nanodrop	Thermo Scientific Inc.
Thermaldrucker Mitsubishi	Bio-Rad Laboratories
Thermocycler GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems
Thermocycler Tgradient	Biometra GmbH
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Tischzentrifuge Mini Spin Plus	Eppendorf AG
Ultraviolet irradiator, Bio-Link Cross linker BLX 365nm	Viler Lourmat
Vacuum blotter, TDNA, Model 230600	Appligene Oncor
Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	GFL GmbH

### 2.1.2 Chemikalien

In der folgenden Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien mit deren Herstellern aufgeführt.

**Tabelle 2.2: Eingesetzte Chemikalien und deren Bezugsquelle**

Substanz	Hersteller
Aquadest	Sigma-Aldrich GmbH
Chloroform	Sigma-Aldrich GmbH
<i>EcoRI</i> Endonuklease	Thermo Fisher Scientific Inc.
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	ServaElectrophoresis GmbH
Ethanol (96%)	Merck KGaA
Ethidiumbromid 10 mg/ml	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Gel Loading Buffer 10x	Invitrogen AG
Gene Ruler 100 bp	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gene Ruler 1Kb Ladder Puls	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kaliumchlorid (KCl)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Kaliumhydroxid (KOH)	JenapharmLaborchemie
Kalziumchlorid ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Merck KGaA
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Natriumazid	VEB SprengstoffwerkSchönebeck
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Natriumlaurylsulfat (SDS)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Phenol/Chloroform/IsoamylAlkohol (25:24:1)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific Inc.
RNase A	Quiagen GmbH
S1 Nuclease 100 u/ $\mu\text{l}$	Thermo Fisher Scientific Inc.
Salzsäure 37 % (HCL)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
SeaKem Gold Agarose	Lonza AG
Thioharnstoff ( $\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$ )	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	CARL ROTH GmbH & Co. KG
Tris-HCl	Merck KGaA
Trypton	Becton, Dickinson & Co.
Tween 20	CARL ROTH GmbH & Co. KG
<i>XbaI</i> Nuclease	Thermo Fisher Scientific Inc.

### 2.1.3 Chemotherapeutika

In Tabelle 2.3 sind die im Mikrobouillon-Verdünnungstest eingesetzten Antibiotika, deren Bezugsquelle, Lösungsmittel sowie die maximal eingesetzte Konzentration aufgeführt.

**Tabelle 2.3: In MHK-Mikrobouillon verwendete Chemotherapeutika**

Substanz	Lösungsmittel	max. Konzentration [mg/l]	Hersteller
Amikacin	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Ampicillin	ddH <sub>2</sub> O	16	Sigma-Aldrich GmbH
Cefotaxim	ddH <sub>2</sub> O	16	Sanofi-Aventis GmbH
Cefoxitin	ddH <sub>2</sub> O	32	Sanofi-Aventis GmbH
Cefotiam	ddH <sub>2</sub> O	8	Grünenthal GmbH
Ceftazidim	ddH <sub>2</sub> O	16	Sanofi-Aventis GmbH
Chloramphenicol	EtOH (96 %)	32	Sigma-Aldrich GmbH
Ciprofloxacin	HCl (0,1 M)	64	Fuka Chemie GmbH
Gentamicin	ddH <sub>2</sub> O	8	Sanofi-Aventis GmbH
Kanamycin	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Mezlocillin	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Nalidixinsäure	ddH <sub>2</sub> O	32	Sigma-Aldrich GmbH
Oxytetracyclin	HCl (0,1 M)	8	Sigma-Aldrich GmbH
Streptomycin	ddH <sub>2</sub> O	64	Sigma-Aldrich GmbH
Sulbactam	ddH <sub>2</sub> O	8	Sanofi-Aventis GmbH
Sulfameracin	NaOH (0,1 M)	512	Sanofi-Aventis GmbH
Sulfmethoxazol/Trimethoprim	DMF	128	Sigma-Aldrich GmbH

Die in Form von Testplättchen verwendeten Antibiotika für Agar-Diffusionstests mit Angabe der eingesetzten Menge und deren Hersteller sind in Tabelle 2.4 aufgeführt.

**Tabelle 2.4: Verwendete Antibiotika-Testplättchen**

Substanz	Menge [mg]	Hersteller
Cefepim	30	Oxoid GmbH
Ertapenem	10	Oxoid GmbH
Imipenem	10	Oxoid GmbH



### 2.1.4 Kits

Für zahlreiche molekularbiologische Methoden können bereits vorbereitete und zusammengestellte Reagenzien bezogen werden. Eine Auflistung der verwendeten Kits befindet sich in Tabelle 2.5.

**Tabelle 2.5: Verwendete Kits**

<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems Inc.
DIG High-Prime	Hoffmann–La Roche AG
DIG Nucleic Acid Detection Kit	Hoffmann–La Roche AG
DNeasy Blood & Tissue Kit	QIAGEN GmbH
DreamTaq PCR Master Mix 2x	Thermo Fisher Scientific Inc.
GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+	Hoffmann–La Roche AG
GS Rapid Library MID Adaptors Kit	Hoffmann–La Roche AG
GS Rapid Library Prep Kit	Hoffmann–La Roche AG
GS Titanium MV emPCR Kit (Lib-L) v2	Hoffmann–La Roche AG
Nextera® DNA Sample Preparation Kit	Illumina Inc.
Nextera® Index Kit	Illumina Inc.
Plasmid Mini Kit	QIAGEN GmbH
TruSeq Dual Index Sequencing Primer Kit, Paired End	Illumina Inc.
TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot–HS	Illumina Inc.
TruSeq SBS Kit v3–HS	Illumina Inc.
500-Cycle v2	Illumina Inc.

### 2.1.5 Medien und Standardlösungen

Die in Tabelle 2.6 aufgeführten Nährmedien wurden im Labor für Nährmedien des Robert Koch-Instituts hergestellt. Die Zubereitung erfolgte nach Herstellerangaben.

**Tabelle 2.6: Verwendete Nährmedien**

<b>Nährmedium</b>	<b>Hersteller</b>
Brain-Heart-Infusion (BHI) Agar	Oxoid GmbH
Brain-Heart-Infusion (BHI) Bouillon	Oxoid GmbH
Gallsäure-Chrysoidin-Glycerol-(GCG)-Selektions-Agar	Oxoid GmbH
Luria-Bertani (LB) Agar	Alpha-Biosciences Inc.
Luria-Bertani (LB) Bouillon	Alpha-Biosciences Inc.
Müller-Hinton (MH) Agar	Oxoid GmbH
Müller-Hinton (MH) Agar mit Schafblut	Oxoid GmbH
Nährbouillon	Becton, Dickinson & Co.

Des Weiteren wurden folgende Lösungen als Puffer für die Agarose-Gelelektrophorese verwendet und nach folgenden Vorschriften angesetzt.

10x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE): 890 mM Tris  
20 mM EDTA  
890 mM Borsäure

Ladepuffer für Agarosegele: 40 mg Na<sub>2</sub>-EDTA  
4 g Saccharose  
3 mg Bromphenolblau  
add 10 ml ddH<sub>2</sub>O

Tris und EDTA wurden mit ddH<sub>2</sub>O gemischt, danach wurde die Borsäure zugegeben. Für die Agarose-Gele und die Gelelektrophorese wurde 1×TBE-Puffer verwendet. Weiterhin wurde eine Ethidiumbromid-Stammlösung von 1 mg/ml mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt und bei 4 °C gelagert. Für das Gelfärbebad wurden 100 µl Ethidiumbromid-Stammlösung mit 1 l ddH<sub>2</sub>O gemischt.

### 2.1.6 PCR-Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten PCR-Primer wurden von Invitrogen bezogen und sind in Tabelle 2.7 aufgeführt.

**Tabelle 2.7: Verwendete PCR-Primer**

Primer-Name	Ta [°C]	Produkt [bp]	Sequenz	Referenz
aac(6')-1b-cr fwd	55	482	5'-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA-3'	Park <i>et al.</i> 2006 [105]
aac(6')-1b-cr rev			5'-CTCGAATGCCTGGCGTGTTC-3'	
AAC-ges fwd	60	1100	5'-TACCTGTCTGGCAGCAACTG-3'	Eller <i>et al.</i> 2013 [93]
AAC-ges rev			5'-TTTTATACGCCACCGTCACTC-3'	
ardA FW	60	501	5'-ATGTCTGTTGTTGCACCTGC-3'	Garcia <i>et al.</i> 2008 [106]
ardA RV			5'-TCACCGACGGAACACATGACC-3'	
ChuA.1	55	279	5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3'	Clermont <i>et al.</i> 2000 [107]
ChuA.2			5'-TGCCGCCAGTACCAAAGACA-3'	
CMY-2 F	60	350	5'-AATCGTTATGCTCCGCTCTG-3'	Eller <i>et al.</i> 2013 [93]
CMY-2 R			5'-CTGTTTGCCTGTCTAGTTCTGG-3'	
CTX-M universal fwd	55	551	5'-CGCTTTGCGATGTGCAG-3'	Gröbner <i>et al.</i> 2009 [108]
CTX-M universal rev			5'-ACCGCGATATCGTTGGT-3'	
CTX-M-14c fwd	60	786	5'-GCTTTATGCGCAGACGAGTG-3'	diese Arbeit
CTX-M-14c rev			5'-ATGATTCTCGCCGCTGAAG-3'	
CTX-M-21 fwd	60	304	5'-ACACGGATTGACCGTATTGG-3'	diese Arbeit
CTX-M-21 rev			5'-TGCTTTTGCCTTCACTCTG-3'	
CTX-M-26-FWD	60	847	5'-GCGATGTTAATGACGACAGC-3'	Eller <i>et al.</i> 2013 [93]
CTX-M-26-REV			5'-AACCGTCGGTGACAATTCTG-3'	
CTX-M-2-ges fwd	60	861	5'-CATTCGCCGCTCAATGTTA-3'	diese Arbeit
CTX-M-2-ges rev			5'-CAGAAACCGTGGGTTACGAT-3'	
CTX-M-8 fwd	60	637	5'-TAACGCACAGACGCTCTACC-3'	Eller <i>et al.</i> 2013 [93]

CTX-M-8 rev			5'-TGGCTGGGTGAAGTAAGTGAC-3'	
CTX-M-9-MP fwd	55	356	5'-GCAGTACAGCGACAATACCG-3'	Gröbner <i>et al.</i> 2009 [108]
CTX-M-9-MP rev			5'-TATCATTTGGTGGTGCCGTAG-3'	
CTX-M-ges fwd	58	968	5'-TTCGTCTCTTCCAGAATAAGG-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
CTX-M-ges rev			5'-CAGCACTTTTGCCGTCTAAG-3'	
GES F	60	744	5'-GAAGCTAGAGCGCGAAAAAG-3'	diese Arbeit
GES R			5'-ACTTGACCGACAGAGGCAAC-3'	
IncFII fw	52	270	5'-CTGTCGTAAGCTGATGGC-3'	Carattoli <i>et al.</i> 2005 [110]
IncFII rv			5'-CTCTGCCACAACTTCAGC-3'	
IncHI2 fw	60	644	5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC-3'	Carattoli <i>et al.</i> 2005 [110]
IncHI2 rv			5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	
IncI1 fw	60	139	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	Carattoli <i>et al.</i> 2005 [110]
IncI1 rv			5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	
IncN fw	60	559	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	Carattoli <i>et al.</i> 2005 [110]
IncN rv			5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'	
PER F	60	636	5'-CCTGACGATCTGGAACCTTT-3'	diese Arbeit
PER R			5'-TCCATCAGGCAACAGAATGA-3'	
piIL FW	60	316	5'-CCATATGACCATCCAGTGCG-3'	Garcia <i>et al.</i> 2008 [106]
piIL RV			5'-AACCACTATCTCGCCAGCAG-3'	
Qnr A fwd	60	513	5'-ATTTCTCACGCCAGGATTTG-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
Qnr A rev			5'-CGGCAAAGGTTAGGTCACAG-3'	
Qnr B fwd	60	612	5'-CAAATATGGCTCTGGCACTC-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
Qnr B rev			5'-ACGATGCCTGGTAGTTGTCC-3'	
Qnr C fwd	60	400	5'-ATTTCCAAGGGGCAAAGTG-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
Qnr C rev			5'-AACTGCTCCAAAAGCTGCTC-3'	
Qnr D fwd	60	521	5'-TTGTGATTTTTCAGGGGTTG-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
Qnr D rev			5'-CCTGCTCTCCATCCAAGTTC-3'	
Qnr S fwd	60	619	5'-CGGCACCACAACTTTTCAC-3'	Pfeifer <i>et al.</i> 2009 [109]
Qnr S rev			5'-CAACAATACCCAGTGCTTCG-3'	
repI1 FW	60	142	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	Garcia <i>et al.</i> 2008 [106]
repI1 RV			5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'	
SHV neu fwd	55	938	5'-GCAAAACGCCGGGTTATTC-3'	Gröbner <i>et al.</i> 2009 [108]
SHV rev			5'-GGTTAGCGTTGCCAGTGCT-3'	
SHV-MP1 fwd	55	750	5'-TTCGCCTGTGTATTATCTCC-3'	Gröbner <i>et al.</i> 2009 [108]
SHV-MP1 rev			5'-TCCGCTCTGCTTTGTTATTC-3'	
sogS FW	60	291	5'-TTCCGGGGCGTAGACAATACT-3'	Garcia <i>et al.</i> 2008 [106]
sogS RV			5'-AACAGTGATATGCCGTCGC-3'	
TEM universal fwd	55	851	5'-ATGAGTATTCAACATTTCCG-3'	Gröbner <i>et al.</i> 2009 [108]
TEM universal rev			5'-TTAATCAGTGAGGCACCTAT-3'	
trbA FW	60	507	5'-CGACAAATGCTTCCGGGGT-3'	Garcia <i>et al.</i> 2008 [106]
trbA RV			5'-TCTTACAATCGACAGCCTGT-3'	
TspE4C2.1	55	152	5'-GAGTAATGTCGGGGCATTCA-3'	Clermont <i>et al.</i> 2000 [107]
TspE4C2.2			5'-CGCGCCAACAAAGTATTACG-3'	
VEB-gesamt F	60	821	5'-TTCAAATGCTCAAAGTACAAC-3'	diese Arbeit
VEB-gesamt R			5'-TCCACGTTATTTTGCAATGTC-3'	
YjaA.1	55	211	5'-TGAAGTGTCAGGAGACGCTG-3'	Clermont <i>et al.</i> 2000 [107]
YjaA.2			5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	

### 2.1.7 Software und Online-Ressourcen

Die für diese Arbeit verwendeten Programme sowie die benutzten Online-Ressourcen sind in Tabelle 2.8 aufgeführt.

**Tabelle 2.8: Verwendete Software und Online-Ressourcen**

Software	Verwendungszweck	Referenz
Artemis	Bearbeitung von Sequenzdaten	Freeware (Rutherford <i>et al.</i> 2000) [111]
BEAST v1.7.4	Phylogenetische Analysen	Freeware (Drummond & Rambaut 2007) [112]
BEAUTi v1.7.4	Generieren von BEAST XML Dateien	Freeware (Drummond, Rambaut & Suchard 2012) [113]
Bionumerics v6.5	Erstellen von Minimum-Spanning-Trees	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
BLAST v2.2.23+	Paarweise Sequenzvergleiche	Freeware (Altschul <i>et al.</i> 1990) [114]
BWA v0.6.2	Read Mapping	Freeware (Li & Durbin 2010) [115]
Celera	Assembly korrigierter PacBio RS Reads	Freeware (Myers <i>et al.</i> 2000) [116]
DnaSP 5.10.01	Detektion von homoplastischen SNPs	Freeware (Librado & Rozas 2009) [117]
eBURST v3	Einordnung von ST514 in die <i>K. pneumoniae</i> Populationsstruktur	Freeware (Feil <i>et al.</i> 2004) [118]
FastQC	Qualitätskontrolle von Illumina-Reads	<a href="http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk">http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk</a>
FigTree v1.4	Bearbeitung phylogenetischer Stammbäume	<a href="http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/">http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/</a>
Geneious R6	Auswertung von Sanger-Sequenzdaten	Biomatters Ltd.
Kodon v3.6.1	Vergleichende Genomanalysen	Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgien
Mauve v2.3.1	Ganzgenom-Alignment	Freeware (Darling, Mau & Perna 2010) [119]
MEGA v5	Sequenzalignments	Freeware (Tamura <i>et al.</i> 2007) [120]
Newbler	Assembly von 454 Sequenz-Reads	Hoffmann-La Roche AG
pacBioToCA	Korrektur der PacBio RS Reads	Freeware (Pacific Biosciences)
Path-O-Gen v1.3	Detektion des zeitlichen Signals in Sequenzdaten	Freeware (Rambaut 2010) [121]
PAUP* v4.0b10	Phylogenetische Analysen	Sinauer Associates, Sunderland, USA (Wilgenbusch & Swofford 2003) [122]
PHAST	Identifizierung von Prophagen	Online-Werkzeug (Zhou 2011) [123]
Primer3 v0.4.0	Entwurf von Oligonukleotid-Primern	Freeware (Rozen & Skaletsky 2000) [124]
RAST Server	Genomannotation	Online-Werkzeug (Aziz <i>et al.</i> 2008) [125]
SAMtools v0.1.18	Alignmentverarbeitung	Freeware (Li <i>et al.</i> 2009) [126]
Seaview v4.2.3	Alignmentvisualisierung und Maximum-Likelihood-Berechnungen	Freeware (Gouy <i>et al.</i> 2010) [127]
SigmaPlot v11.0	Datenauswertung	SPSS Inc., Chicago, USA
SMRT Portal v1.3.2	Qualitätskontrolle von PacBio RS Reads	Freeware (Pacific Biosciences)
SPAdes v3.0	Assembly von MiSeq-SequenzReads	(Bankevich <i>et al.</i> 2012) [128]
SplitsTree v4.12.8	Detektion von homoplasischen SNPs	Freeware (Huson & Bryant 2006) [129]
Tracer v1.5	Visualisierung von MCMC Output	Freeware (Drummond & Rambaut 2007) [112]
Varscan v2.3	SNP-Detektion	Freeware (Koboldt <i>et al.</i> 2012) [130]

### 2.1.8 Sequenzierplattformen

In dieser Arbeit kamen verschiedene Sequenziermethoden der unterschiedlichen Generationen zum Einsatz. Die Sequenzierungen wurden zum Teil am Zentrum für Biologische Sicherheit des RKI Berlin, am RKI Wernigerode oder beim kommerziellen Sequenzieranbieter GATC in Koblenz durchgeführt.

Die im RKI Berlin produzierten Rohdaten wurden anschließend zurück nach Wernigerode übermittelt. Im Falle der von GATC durchgeführten PacBio-Sequenzierung wurde ein kostenpflichtiger Bioinformatikservice zur Erstellung eines Genom-Assembly in Anspruch genommen. Die verwendeten Sequenziergeräte und deren Hersteller können Tabelle 2.9 entnommen werden.

**Tabelle 2.9: Sequenzierplattformen**

Methode	Plattform	Hersteller	Einrichtung
Sanger-Sequenzierung	3130xl Genetic Analyzer	Applied Biosystems	RKI, Berlin
454-Pyrosequenzierung	454 GS FLX	Hoffmann–La Roche AG	RKI, Berlin
Illumina <i>paired end</i>	HiScan 2000	Illumina Inc.	RKI, Berlin
	MiSeq		RKI, Wernigerode
Einzelmolekülsequenzierung	PacBio RS II	Pacific Biosciences	GATC Biotech AG

### 2.1.9 Verwendete Bakterienisolate

Die in dieser Arbeit analysierten bakteriellen Isolate sind in Anhang I aufgeführt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Mikrobiologische und molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung

Von allen in dieser Arbeit verwendeten Studienisolaten wurden die minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) gegen zwölf Antibiotika (siehe Tabelle 2.3) mittels Mikrobouillon-Verdünnungstest ermittelt. Bei der MHK handelt es sich um die niedrigste Konzentration (Verdünnungsstufe) einer antimikrobiellen Substanz bei der kein Wachstum des zu untersuchenden Bakterienstammes mehr möglich ist. Es werden bei dieser Methode sogenannte Stellvertretersubstanzen für die verschiedenen Antibiotikaklassen getestet. Zur Interpretation der Resistenz bzw. Empfindlichkeit wurden die EUCAST-Grenzwerte [131] angewendet. Waren für die jeweiligen Substanzen keine EUCAST-Grenzwerte verfügbar,

wurden die Grenzwerte des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) [132] verwendet. Im Falle von Oxytetracyclin wurden die Grenzwerte der deutschen Industrienorm (DIN) herangezogen, da für dieses Antibiotikum auch kein CLSI-Grenzwert existiert. Weiterhin wurde die Empfindlichkeit gegenüber den Carbapenemen Imipenem, Ertapenem sowie dem Viertgenerations-Cephalosporin Cefepim mittels Testplättchen im Agar-Diffusionstest (Messung des Hemmhofdurchmessers) bestimmt (Tabelle 2.4). Die MHK für alle getesteten Isolate sind Anhang I zu entnehmen.

### **2.2.1.2 Extraktion von DNA für PCR-Analysen**

Für alle PCR-basierten Analysen wurde sogenannte Koch-DNA hergestellt [133]. Hierzu wurden ein bis drei Kolonien des zu untersuchenden Stammes von der über Nacht bei 37 °C bebrüteten MH-Blut-Agarplatte in 100 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O suspendiert und für zehn Minuten bei 97 °C erhitzt. Anschließend wurde die Suspension bei 14 500 rpm fünf Minuten zentrifugiert und die im Überstand gelöste DNA in die PCR-Reaktionen eingesetzt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -20 °C.

### **2.2.1.3 Extraktion von genomischer DNA für die Ganzgenomsequenzierung**

Zur Präparation genomischer DNA für die Ganzgenom-Sequenzierung wurde das DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN GmbH) verwendet. Die Extraktion erfolgte nach Herstellerprotokoll für Gram-negative Bakterien inklusive des optionalen RNase-Verdaus mittels RNase A (100 mg/ml) (Quiagen GmbH) für vier Minuten bei Raumtemperatur. Zur Kontrolle wurden 3 µl Eluat auf ein 1,4 % Agarosegel aufgetragen und bei 140 V etwa 45 Minuten aufgetrennt. Die finale Konzentration der extrahierten DNA wurde anschließend photometrisch mittels Nanodrop (Thermo Scientific Inc.) bestimmt.

### **2.2.1.4 Extraktion von plasmidischer DNA**

Die Extraktion von plasmidischer DNA erfolgte mittels des Plasmid Mini Kit (QIAGEN GmbH) nach Herstellerangaben. Die extrahierte Plasmid-DNA wurde anschließend nativ auf ein 0,8 % Agarosegel aufgetragen und bei 80 V ca. drei Stunden aufgetrennt. Als Plasmid-Größenstandard wurden die Plasmide der *E. coli*-Stämme V517 [134] und *E. coli* K-12 R222 [135] verwendet. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

### 2.2.1.5 Pulsfeld-Gelelektrophorese

Bei der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) wird im Unterschied zur herkömmlichen Gelelektrophorese ein alternierendes Spannungsfeld angelegt. Dieses wird durch hexagonal angeordnete Elektrodenpaare erzeugt, die in definierten Zeitabständen alternierend die Funktion von Katode oder Anode übernehmen. Durch diesen wiederholten Wechsel der Polarität können vor allem große DNA-Fragmente von bis zu einigen Megabasen (Mb) in hoher Auflösung aufgetrennt werden. Die aufzutrennenden Fragmente werden mittels Restriktions-Endonukleasen erzeugt. Die bakterielle DNA wird hierzu in Agaroseblöckchen immobilisiert und Proteine durch Proteinase K verdaut [136]. Die hier verwendeten PFGE-Verfahren wurden von Frau Christine Günther am RKI Wernigerode wie im Folgenden beschrieben durchgeführt.

Der zu analysierende Bakterien-Stamm wurde für beide Analysemethoden bei 37 °C über Nacht auf Müller-Hinton-Agarplatten angezogen. Anschließend wurden 1,5 ml Bakteriensuspension in Zellsuspensions- (CSB)-Puffer hergestellt und eine OD<sub>600</sub> von 0,3-0,44 eingestellt. Die Flüssig-Agarose zur Herstellung der Blöckchen wurde aus 56 mg Sea Kem Gold Agarose (Lonza AG), 5 ml TE-Puffer und 270 µl 20 % SDS-Lösung gemischt. 300 µl Bakteriensuspension wurden mit 15 µl Proteinase K (20mg/ml) (Thermo Fisher Scientific Inc.) bei 37 °C vorinkubiert und zusammen mit 315 µl der zuvor beschriebenen flüssigen Agarose in die Blöckchen-Gießform gefüllt. Die Blöckchen wurden dann zusammen mit 25 µl Proteinase K (20mg/ml) (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 5 ml Lysepuffer drei Stunden bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Die fertigen Blöckchen wurden zweimal 15 Minuten mit 56 °C warmen ddH<sub>2</sub>O und anschließend dreimal mit TE-Puffer gewaschen. Die Aufbewahrung der Blöckchen erfolgte über Nacht bei 4 °C. Anschließend erfolgte der Verdau mit Restriktions-Endonukleasen. In dieser Arbeit wurden die *Xba*I- und die *S*1-Endonuklease verwendet. Als Fragment-Größenstandard wurde der *Salmonella enterica* Braenderup-Stamm H9812 verwendet [137].

#### Lösungen:

Zellsuspensionspuffer (CSB): 100 mM Tris  
100 mM EDTA  
pH 8,0

---

Lysepuffer:	50 mM Tris 50 mM EDTA 1 % Sarcosyl pH 8,0
Proteinase K Stammlösung:	20 mg/ml
TE-Puffer:	10 mM Tris-HCL (pH 8,0) 1 mM EDTA
TBE-Puffer 10x:	890 mM Tris 20 mM Borsäure 890 mM EDTA pH 8,3 750 ml/l 1 % Thioharnstoff

## ***Xba*I-PFGE**

Das Restriktionsenzym *Xba*I (Thermo Fisher Scientific Inc.) wurde verwendet um phylogenetische Beziehungen zwischen Bakterienstämmen anhand des Vergleiches von DNA-Restriktionsmustern aufzuzeigen. Aufgrund der, durch den Verdau der genomischen DNA, entstehenden Bandenmuster können Aussagen über phylogenetische Beziehungen zwischen den untersuchten Bakterienstämmen getroffen werden.

Nach einem dreißigminütigen Equilibrierungsschritt mit 3,6 ml ddH<sub>2</sub>O und 400 µl Puffer bei Raumtemperatur wurden die Blöckchen zum Verdau der DNA bei 37 °C über Nacht mit 32 µl *Xba*I (500 U/µl), 320 µl Puffer B (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 2,8 ml ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) abgestoppt. Die Blöckchen wurden daraufhin auf einem Gelkamm fixiert und in ein 1,2 % Agarosegel eingebettet. Das fertige Gel wurde in die mit 0,5x TBE-Puffer unter Zusatz von Thioharnstoff gefüllte PFGE-Kammer eingebracht. Die Interpretation der Bandenmuster erfolgte nach Tenover *et al.* 1995 [96].

Laufbedingungen: Pulszeiten: 12,6 s Initialzeit/40 s Finalzeit  
Startratio: 1  
Spannung: 6 V/cm  
Stromstärke: 140 mA  
Laufzeit 20-22 h; Winkel 120°



## **S1-PFGE**

Der S1-Nuklease-Verdau wurde verwendet um die Größe bakterieller Plasmide zu ermitteln. S1-Nuklease schneidet Plasmide einfach und linearisiert diese damit. Die Größenanalyse der Plasmide wird somit nicht durch deren Konformation beeinflusst. Die Durchführung erfolgte nach Barton *et al.* 1995 [138].

Die Herstellung der Agaroseblöckchen erfolgte wie bereits im Falle der *Xba*I-PFGE beschrieben. Nach einem dreißigminütigen Equilibrierungsschritt mit 2 ml ddH<sub>2</sub>O und 500 µl Puffer bei Raumtemperatur wurden die Blöckchen zum Verdau der DNA bei 37 °C 45 Minuten mit 2 µl S1-Nuklease (100 U/µl) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 75 µl Puffer Tango (Thermo Fisher Scientific Inc.) und 1,45 ml ddH<sub>2</sub>O inkubiert. Nach diesem Schritt wurde die Reaktion mit 10 µl 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) abgestoppt. Anschließend wurden die Agaroseblöckchen wie im Abschnitt *Xba*I-PFGE beschrieben in ein Agarosegel eingebettet.

Laufbedingungen: Pulszeiten: 5 s Initialzeit/35 s Finalzeit  
 Startratio: 1  
 Spannung 6 V/cm  
 Stromstärke: 140 mA  
 Laufzeit: 20-22 h; Winkel 120°

## **2.2.1.6 Southern Blot und Hybridisierung**

### **a) Blotting**

Beim Southern Blotting werden mittels Agarose-Gelelektrophorese oder PFGE aufgetrennte DNA-Fragmente durch Vakuum-Blotting auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Oberfläche der Membran ist positiv geladen, so dass die negativ geladene DNA daran binden kann. Anschließend an diesen Vorgang können mittels einer Hybridisierung mit einer markierten DNA-Sonde spezifische Gensequenzabschnitte detektiert und per Lumineszenz-Verfahren sichtbar gemacht werden.

In dieser Arbeit wurde Southern Blotting dazu verwendet DNA aus S1-PFGE-Plasmid-Analysen auf eine Nylon-Membran zu übertragen. Der Blot wurde nach Angaben des Geräteherstellers (Appligene Oncor) aufgebaut. Der Blot-Vorgang erfolgte bei einem Saugdruck von 50 mbar. Die Blot-Puffer I bis III wurden jeweils 30 Minuten lang auf das Gel appliziert. Anschließend wurde der Blot für 120 Minuten mit SCC-Lösung inkubiert. Nach der

Entnahme der Membran aus der Apparatur wurde die DNA mittels UV-Licht bei 150 mJ im Bio-Link Cross linker (Viler Lourmat) für 30 Sekunden fixiert. Danach wurde die Membran mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet.

### Lösungen:

Blot-Puffer I:	HCl	0,25 M
Blot-Puffer II:	NaOH	0,5 M
	NaCl	1,5 M
Blot-Puffer III:	Tris	1 M
	NaCl	2 M
SSC (Stammlösung, 20x):	NaCl	3 M
	Natriumcitrat	0,3 M

### **b) Herstellung einer Hybridisierungs-Sonde**

Unter Verwendung des PCR-basierten Dioxigenin-(DIG) High Prime-Systems (Hoffmann–La Roche AG) wurde die DNA-Sonde mit DIG-11-dUTP markiert. Anhand des Herstellerprotokolls wurden 40 µl des PCR-Produkts bei 96 °C für zehn Minuten denaturiert. Nach dem unmittelbaren Abkühlen auf Eis wurden 10 µl DIG High Prime-Lösung hinzugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 65 °C für 10 Minuten abgestoppt. Vor der Hybridisierung wurde die Sonde zur Denaturierung zehn Minuten bei 95 °C erhitzt und unmittelbar auf Eis abgekühlt. Die Nukleotidsequenz des verwendeten Primer CTX-M universal ist Tabelle 2.7 zu entnehmen.

### **c) Detektion**

Die immunochemische Detektion wurde mittels des DIG Nucleic Acid Detection Kit (Hoffmann–La Roche AG) durchgeführt. Bei diesem Verfahren binden Phosphatase-gebundene Antikörper an die DIG-markierte DNA-Sonde. Die dabei entstehende Phosphataseaktivität kann durch das Chemilumineszenz-Substrat CDP-Star detektiert werden. Hierzu wurde die Membran zunächst mit Detektions-Puffer I, welchem 0,3 % Tween zugesetzt wurde, gewaschen. Um unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden, wurde die Membran mit 60 ml Detektions-Puffer II 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend fand eine dreißigminütige Inkubation der Membran mit 40 ml Detektions-Puffer II statt in dem 8 µl des Anti-DIG-Antikörpers (1:10000) gelöst wurden. Nicht gebundene Antikörper wurden in einem fünfzehnminütigen Waschschrift mit 50 ml Detektions-Puffer I entfernt. Anschließend wurde die Membran mit 10,5 µl CDP-Star-Lösung und 1,5 ml Detektions-Puffer III behandelt und fünf Minuten im Dunklen belassen. Anschließend wurde die Lichtemission mittels des GelDoc XRS detektiert.

Blockierungslösung (Stammlösung): Blockierungs-Reagenz 10 %  
in Hybridisierungspuffer I

Detektions-Puffer I:	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15 M
	pH 7.5	
Detektions-Puffer II:	Blockierungslösung	1 x
	Detektions-Puffer I	9 x
Detektions-Puffer III:	Tris-HCl	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	50 mM
	pH 9,5	

### 2.2.1.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der in-vitro-Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte, in dieser Arbeit insbesondere von  $\beta$ -Laktamase-Genen. Alle PCR-Analysen wurden unter Verwendung des DreamTaq PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) durchgeführt, welcher Taq-Polymerase, Desoxyribonukleotide und PCR-Puffer beinhaltet. Die PCR-Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 25 µl angesetzt, welches ein entsprechendes Primer-Paar, DNA und nukleasefreies Wasser beinhaltete. Alle verwendeten PCR-Primer wurden von Invitrogen bezogen und sind in Tabelle 2.7 aufgeführt. Die PCR-Bedingungen wurden abhängig von der Annealing-Temperatur der gewählten Primer und der Länge des erwarteten Amplifikats gewählt. PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel-Elektrophorese (1,4 % Gel) und anschließender Ethidiumbromid-Färbung visualisiert.

---

Standard PCR-Ansatz:	DreamTaq PCR Master Mix 2 x	12,5 µl
	Primer Forward und Reverse	je 200 nM
	DNA	ca. 10 ng
	Nukleasefreies ddH <sub>2</sub> O	ad 25 µl

Standard PCR-Bedingungen:	95 °C	Initiale Denaturierung	5 min
	30 bis 35 Zyklen	:	
	95 °C	Denaturierung	30 sec
	T <sub>A</sub>	Annealing	30 sec
	72 °C	Elongation	30 sec
	72 °C	Finale Elongation	10 min

### 2.2.1.8 Multilocus sequence typing (MLST)

Bei dieser Methode der Typisierung werden spezifische Abschnitte in den Sequenzen verschiedener bakterieller Haushaltsgene mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Durch Punktmutationen innerhalb dieser Sequenzstücke können in verschiedenen Bakterienstämmen verschiedene Allele unterschieden werden. Bestimmten Kombinationen von Allelen können nun Sequenztypen (ST) zugeordnet werden, nach welchen Bakterienstämme klassifiziert werden können [139]. Die Sequenz der Allele *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB* für das Multilocus sequence typing von *K. pneumoniae* nach Diancourt *et al.* 2005 wurden aus den Ganzgenomsequenzdaten extrahiert. Die Auswertung erfolgte unter Benutzung der *K. pneumoniae* MLST-Datenbank (<http://www.pasteur.fr>) [94].

### 2.2.1.9 Bestimmung der phylogenetischen Gruppe von *E. coli*

Aus phylogenetischen Analysen ist bekannt, dass *E. coli* sich in vier phylogenetische Hauptgruppen (A, B1, B2, D) einteilen lässt und dass virulente Stämme eher den Gruppen B2 und D angehören. Die Bestimmung der phylogenetischen Gruppen der in dieser Arbeit charakterisierten *E. coli*-Isolate erfolgte PCR-basiert nach Clermont *et al.* [107]. Dabei wurden drei Marker im *E. coli*-Genom mittels PCR amplifiziert. Bei diesen Markern handelt es sich zum einen um das Gen *chuA* aus dem enterohämorrhagischen *E. coli* O157:H7, das Gen *yjaA* aus *E. coli* K-12 und das DNA Fragment TSPE4.C2. Anhand der An- bzw. Abwesenheit dieser Marker kann dann die phylogenetische Gruppe ermittelt werden.

### 2.2.1.10 PCR-basierte Plasmid-Replikontypisierung

Bei der PCR-basierten Replikon Typisierung (PBRT) handelt es sich um eine Typisierungsmethode für bakterielle Plasmide. Dabei werden Replikon-spezifische Gene für die Inkompatibilitäts-Determinanten der verschiedenen Replikontypen mittels PCR amplifiziert. Anhand der An- bzw. Abwesenheit der jeweiligen PCR-Produkte lassen sich so die Inkompatibilitätsgruppen (Inc) der Plasmide bestimmen. Die Durchführung erfolgte mittels der Carattoli *et al.* [110] publizierten Primer für die Inc-Gruppen IncHI1, IncI1, IncN und IncFII (Tabelle 2.7) nach dem, im Abschnitt 2.2.1.7 beschriebenen, Standard PCR-Protokoll.

### 2.2.1.11 Plasmid Multilocus sequence typing (pMLST)

Das Plasmid Multi Locus Sequence Typing (pMLST) basiert auf einem ähnlichen Ansatz, wie das generelle Multi Locus Sequence Typing (MLST). Bei pMLST werden innerhalb der verschiedenen Inc-Gruppen spezifische Gene amplifiziert. Dadurch können Plasmide dieser Inc-Gruppe anhand der ermittelten Allelkombinationen den pMLST-Typen zugeordnet werden. Die Durchführung des Plasmid-MLST für die IncI1-Plasmide der CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Stämme erfolgte nach Garcia-Fernandez *et al.* [106]. Hierbei wurden die Gene *repI1*, *ardA*, *trbA*, *sogS* und *pilL* per PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Auswertung der Allelkombinationen erfolgte mittels der pMLST-Webseite (<http://pubmlst.org/plasmid/>) [140].

### 2.2.1.12 Plasmid Restriktionsfragment-Längenanalyse (Plasmid-RFLP)

Eine weitere Möglichkeit um Verwandtschaftsverhältnisse zwischen Plasmiden zu untersuchen, ist die Plasmid Restriktionsfragment-Längenanalyse (Plasmid-RFLP). Hierbei wird die plasmidische DNA eines Bakterienstammes mit Restriktionsenzymen verdaut und die entstehenden Bandenmuster mittels Agarose-Gelelektrophorese verglichen.

Die Plasmid-RFLP-Analysen der *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmide wurden mittels *EcoRI*-Restriktion (Thermo Fisher Scientific Inc.) von Plasmid-DNA durchgeführt. Der Ansatz der Verdau-Reaktion erfolgte nach Herstellervorschrift. Die Verdauzeit betrug 120 Minuten. Die zu untersuchenden Plasmide wurden zuvor mittels Konjugation in *E. coli* K-12 J53 vereinzelt.

### 2.2.1.13 Konjugationsexperimente

Als Rezipienten-Stamm für Konjugationsexperimente wurde ein Natriumazid-resistenter *E. coli* K-12 J53 verwendet. Donor- und Rezipienten-Stamm wurden in 10 ml Nährbouillon

über Nacht angezogen. Anschließend wurden 100 µl der Suspension des Rezipienten-Stammes und 900 µl des Donor-Stammes in 10 ml Nährbouillon gemischt und wiederum über Nacht bei 37 °C inkubiert. Der Ausstrich erfolgte auf LB-Agar mit 2 mg/l Cefotaxim (Selektionsmarker des Donors) und 200 mg/l Natriumazid (Selektionsmarker des Rezipienten). Nach einer weiteren Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden Transkonjuganten auf den bereits beschriebenen Selektionsplatten vereinzelt. Zur optischen Kontrolle (Koloniefarbe und Morphologie) wurden die zu vereinzeln den Kolonien zusätzlich auf GCG-Agar und MH-Blutagar ausgestrichen. Zur Verifizierung wurden die MHK-Werte der Transkonjuganten ermittelt und mittels PCR die übertragenen Resistenzgene identifiziert.

### **2.2.1.14 Sequenziermethoden**

Im Folgenden soll auf die Sequenziermethoden, welche in dieser Arbeit angewendet wurden, eingegangen werden. Die verschiedenen Methoden wurden von den in Tabelle 2.9 aufgeführten Institutionen durchgeführt.

#### **a) Sanger-Sequenzierung**

Bei der sogenannten Kettenabbruch-Sequenzierung nach Sanger und Coulson [141] handelt es sich um eine enzymatische Methode der DNA-Sequenzierung. Dabei wird ein DNA-Fragment unter Zuhilfenahme eines einzelnen Primers in einer PCR-Reaktion linear verlängert. Neben den Desoxyribonukleotiden (dNTPs) werden auch fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs), welchen die 3'Hydroxyl-Gruppe fehlt, in der Reaktion eingesetzt. Der Einbau eines solchen ddNTPs führt zum Abbruch der Elongation des Amplikons. Die aus diesem Vorgang resultierenden Kettenabbruchprodukte werden mittels Kapillar-Elektrophorese aufgetrennt und der Fluoreszenzfarbstoff der ddNTPs mittels Laser-Licht angeregt. Das emittierte Licht wird per CCD-Kamera detektiert. Das so erstellte Chromatogramm, welches die Information über Position und Art des Nukleotids enthält, repräsentiert die Sequenz der Basen der DNA.

**Sequenzierung von PCR-Produkten (Amplikons).** Die Sequenzierreaktionen in dieser Arbeit wurden mittels des BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Inc.) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung. Die vorbereitenden PCR-Reaktionen wurden am RKI in Wernigerode durchgeführt. Die anschließende Kapillar-Elektrophorese und Fluoreszenzdetektion wurde

im Sequenzierlabor des RKI Berlin auf einem 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) durchgeführt.

Der 10 µL-Sequenzierungsansatz bestand aus folgenden Komponenten:

1	µL	BigDye
0,5	µL	Primer
0,4	µL	PCR-Produkt
Ad 10	µl	ddH2O

Die PCR-Reaktion wurde nach folgenden Bedingungen durchgeführt:

95 °C Initiale Denaturierung 2 min

25 Zyklen:

95 °C Denaturierung 10 sec

T<sub>A</sub> Annealing 5 sec

60 °C Elongation 4 min

### **b) 454-Pyrosequenzierung**

Das Verfahren der Pyrosequenzierung [142] ist die erste Technologie, die zu den „next generation“ Methoden gezählt wird. Der Ablauf der 454-Sequenzierung soll im Folgenden kurz erläutert werden.

Extrahierte DNA wird mittels Zerstäubung in 300 bis 800 bp lange Fragmente geschnitten und an deren Enden Oligonukleotid-Adapter ligiert. Die Gesamtmenge dieser Fragmente wird als *libraries* bezeichnet. In der anschließenden Emulsions-PCR werden die einzelsträngigen DNA Fragmente mittels der Adapter an Polystyrol-Kugeln, die sogenannten *capture beads*, gebunden und in Ölemulsionstropfen klonal amplifiziert. Die beladenen *capture beads* werden in Pikotiterplatten platziert und die Sequenzierchemikalien hinzugegeben. Nun werden abwechselnd die vier dNTP-Typen über die Platte gespült. Sobald ein zum Ausgangsstrang passendes Nukleotid durch die DNA Polymerase eingebaut wird, wird ein Pyrophosphat (PP<sub>i</sub>) abgespalten. Dieses wird von dem Enzym ATP-Sulfurylase in Gegenwart von Adenosin-5'-phosphosulfat (APS) zur Generierung von Adenosintriphosphat (ATP) benötigt. Das generierte ATP dient als Substrat für die durch Luciferase katalysierte Umwandlung von Luziferin zu Oxyluziferin, bei der Energie in Form von Fluoreszenz abgegeben wird. Die Intensität des entstehenden Lichtblitzes ist proportional zur Menge des freiwerdenden ATPs und gibt somit Auskunft darüber welche Anzahl des jeweiligen

Nukleotid eingebaut wurde. Der Vorteil der 454-Pyrosequenzierung liegt in den langen Sequenz-Reads welche mit dieser Methode erzeugt werden können. Die größte Limitation der 454-Pyrosequenzierung hingegen stellt die ungenaue Auflösung von Homopolymeren dar. Da der Einbau von Nukleotiden kontinuierlich erfolgt, steigt bei Homopolymeren nur die Intensität der Lichtemission. Im Fall von langkettigen Homopolymeren kommt es zu einer Übersättigung des Detektors, was zur Folge hat, dass die Länge homopolymerer Regionen nur ungenau ermittelt werden kann [143].

**Sequenzierung des *K. pneumoniae* Isolates 234/12.** Die *libraries* in dieser Arbeit wurden mittels des GS Rapid Library Prep Kit und des GS Rapid Library MID Adaptors Kit (Hoffmann–La Roche AG) erstellt. Die Emulsions-PCR erfolgte unter Verwendung des Titanium MV emPCR Kit (Lib-L) v2 (Hoffmann–La Roche AG). Zur Sequenzierung wurde das GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+ (Hoffmann–La Roche AG) verwendet. Die erreichte Coverage der 454-Sequenzierung betrug 68-fache Abdeckung des Genoms bei einer durchschnittlichen Read-Länge von 513 bp.

### c) Illumina-Sequenzierung

Bei der Illumina-Sequenzierung wird ebenso wie bei der 454-Sequenzierung die DNA fragmentiert. Dies kann auf verschiedene Arten geschehen, wie durch Zerstäubung, Ultraschall oder auch Enzyme. Anschließend werden an die 3'-Enden der fragmentierten DNA Oligonukleotid-Adapter ligiert über welche die DNA an eine Festoberfläche, die sogenannte *flow cell*, gebunden wird. Die gebundenen *libraries* werden nun in einer isothermalen PCR amplifiziert und das Amplifikat wiederum an die *flow cell* gebunden. Dieser Vorgang wird auch als *bridge amplification* bezeichnet. Hierdurch entstehen *cluster* von bis zu 1 000 Fragmentkopien. Die brückenartigen, auf beiden Seiten an die *flow cell* gebundenen, Amplifikate werden nun an einer Seite gelöst an welche dann der Sequenzierprimer hybridisiert wird.

In der Sequenzierreaktion wird ein Nukleotidgemisch benutzt, dessen Nukleotide mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind, welche zusätzlich als reversible 3'-Terminatoren agieren und damit nach ihrer Anlagerung den Einbau weiterer Nukleotide unmöglich machen. Hierdurch wird der Synthesevorgang nach jedem Einbauzyklus unterbrochen und die Fluoreszenz wird für jedes *cluster* von DNA-Fragmenten mittels CCD-



Kamera gemessen. Dadurch wird gewährleistet das Homopolymere deutlich genauer aufgelöst werden [143] als dies mit 454-Sequenziermethoden möglich ist. Der Farbstoff nebst Terminator wird nun wieder abgespalten und ein weiterer Einbauvorgang beginnt.

In dieser Arbeit wurde die sogenannte *paired end*-Sequenzierung durchgeführt. Hierbei werden die DNA-Fragmente von beiden Seiten sequenziert, was je nach *library*-Länge, Information über Orientierung und Abstand der Reads voneinander liefert. Dies hat den Vorteil, dass so Repeat-Regionen, Rearrangements und Insertionen/Deletionen besser detektiert werden können. Der Nachteil der Illumina Technologie besteht darin, dass in jedem Zyklus alle vier Nukleotide gleichzeitig auf die *flow cell* gelangen. Herstellungsbedingt kann nicht gewährleistet werden, dass alle der verwendeten Nukleotide mit einem Fluorophor markiert oder mit einem Terminator versehen sind. So entstehen DNA-Fragmente innerhalb der *cluster*, welche ein anderes Nukleotid anzeigen als die umliegenden Fragmente. Hierdurch können zum einen Fehler in der Sequenz entstehen und zum anderen entsteht ein Hintergrundrauschen, welches die mögliche Länge der Reads beeinflusst.

**Resequenzierung der *K. pneumoniae*-Stämme.** Die Erstellung der *libraries* für die Illumina-Resequenzierung der *K. pneumoniae*-Isolate erfolgte in dieser Arbeit mit dem Nextera DNA Sample Preparation Kit (Illumina Inc.). Zur Indizierung der *libraries* wurde das Nextera Index Kit (Illumina Inc.) verwendet.

Die Sequenzierung erfolgte mittels des TruSeq Dual Index Sequencing Primer Kit, *Paired End* (Illumina Inc.) um 101 bp lange *paired end* Reads zu erzeugen. Die durchschnittliche Coverage des bakteriellen Genoms betrug für das Genom des Referenzstammes (Isolat 234/12) ca. 74-fach. Für alle resequenzierten Isolate wurde eine mindestens 27-fache durchschnittliche Coverage erreicht.

**Sequenzierung der Plasmid-DNA des Referenzisoltes 234/12.** Die Erstellung der *libraries* für die *de novo*-Sequenzierung des Plasmidgenoms des Referenzisolates 234/12 erfolgte mit dem Nextera XT DNA Sample Preparation Kit. Die Sequenzierung wurde mittels der 500-Cycle v2 Chemie für 250 bp lange Reads ausgeführt.

### d) PacBio RS II

Die von Pacific Biosciences entwickelte Technik des PacBio RS II stellt die jüngste der in dieser Arbeit verwendeten Sequenzierplattformen dar. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Methoden ist bei dieser keine Amplifikation der DNA nötig.

Es handelt sich um ein Verfahren bei dem einzelne DNA-Moleküle in Echtzeit sequenziert werden. Das Herzstück dieser Technologie stellt die sogenannte SMRT (*SMRT-single molecule realtime sequencing*) *Cell* dar, welche zehntausende Kavitäten, die ZMWs (*zero-mode waveguides*), besitzen. An deren Boden befindet sich ein immobilisierter Komplex aus DNA-Polymerase und zu sequenzierender DNA. Es werden nun fluoreszenzmarkierte Nukleotide über die SMRT *Cell* gespült, welche in die Kavitäten diffundieren und dort von der Polymerase umgesetzt werden. Die Anregung der von der Polymerase abgespaltenen Fluorophore erfolgt über den Boden der SMRT *Cell*. Aufgrund der extrem geringen Größe der Kavitäten und der großen Wellenlänge des Anregungslichtes kann dieses den Reaktionsraum nicht verlassen, was das Hintergrundrauschen stark minimiert, wodurch sehr hohe Read-Längen möglich sind. Das emittierte Licht wird auch in diesem Verfahren mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet und anschließend in die DNA-Sequenz überführt.

***De novo* Sequenzierung der Plasmid-DNA des Referenzisolates 234/12.** Zur Probenvorbereitung und Sequenzierung wurden jeweils das DNA Template Prep Kit 2.0 und das DNA Sequencing Kit 2.0 verwendet (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA, USA). Die erzielte Coverage des Genoms des Referenzstammes (Isolat 234/12) betrug ca. 17-fach mit einer Anzahl von 42 953 Reads bei einer durchschnittlichen Read-Länge von 2 128 bp. Die PacBio-Sequenzierung wurde vom kommerziellen Sequenzieranbieter GATC in Koblenz durchgeführt.

### **2.2.1.15 Identifikation von $\beta$ -Laktamase-Genen**

Die zu untersuchenden  $\beta$ -Laktam-resistenten Isolate wurden zunächst mittels einer Multiplex-PCR auf das Vorhandensein von ESBL der Gruppen TEM, CTX-M-1/2, SHV und CTX-M-9 vorgetestet. Dies erfolgte mit den Primern TEM universal, CTX-M universal, SHV-MP1 und CTX-M-9-MP. Bei einem positiven Ergebnis für die Gruppe der TEM- $\beta$ -Laktamasen in der PCR wurde das entsprechende Produkt sequenziert (Sanger-Sequenzierung) und seine Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz mit der Datenbank der Lahey Clinic, Burlington verglichen, um den genauen TEM-Typ zu ermitteln (<http://www.lahey.org/studies>). Im Fall von Isolaten, welche in der Multiplex-PCR positiv für die CTX-M-1, SHV oder CTX-M-9-Gruppe

waren wurde jeweils mit den Primern CTX-M-gesamt, CTX-M-2, CTX-M-2a, SHV-neu und CTX-M-14c das gesamte  $\beta$ -Laktamase-Gen amplifiziert und sequenziert. Ergab das Screening per Multiplex-PCR kein positives Ergebnis, wurde mit spezifischen Primern das Vorhandensein seltenerer ESBL (CTX-M-Gruppen 8 und 25; PER-, GES-, VEB-ESBL) untersucht. Die entsprechenden Primer sind in Tabelle 2.7 aufgelistet. PCR-Produkte wurden sequenziert und die erhaltenen Nukleotidsequenzen mit der Lahey-Datenbank abgeglichen um den genauen CTX-M-Typ zu bestimmen.

## **2.2.2 Bioinformatische Methoden**

### **2.2.2.1 Sequenzierungsstrategie**

Zur phylogenetischen Untersuchung des Ausbruchs ESBL-produzierender *K. pneumoniae* sollte zuerst ein aus dem Ausbruch stammendes Referenzgenom *de novo* sequenziert werden, da zum Zeitpunkt des Beginns der Arbeiten kein Genom eines *K. pneumoniae* ST514-Stammes verfügbar war. Zur Sequenzierung des Referenzgenoms (Isolat 234/12) wurde mit der PacBio RS-Technologie ein Verfahren gewählt, welches sehr lange Sequenz-Reads generiert und somit die *de novo* Assemblierung erleichtert. Aufgrund der noch hohen Fehlerrate der PacBio RS-Sequenzierung wurde das Referenzisolat zusätzlich mittels 454/Roche-Technologie sequenziert und diese ebenfalls langen Sequenz-Reads zur Korrektur der PacBio RS-Reads genutzt. Alle weiteren Isolate, inklusive des Ausbruchs-Referenzisolats 234/12, wurden nun mittels Illumina-Technologie sequenziert. Diese liefert zwar kürzere Reads (in dieser Arbeit ca. 100 bp), weist aber im Gegenzug eine deutlich niedrigere Fehlerrate auf. Diese kurzen Reads wurden auf die *de novo* generierte Referenzsequenz gemappt. Das Mappingergebnis des Referenzisolates 234/12 wurde wiederum verwendet, um das Referenzgenom an fünf Homopolymerpositionen zu korrigieren.

#### **2.2.2.2 *De novo*-Sequenzierung eines *K. pneumoniae* ST514 Referenzgenoms**

Von Stamm 234/12 wurde DNA mittels Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN GmbH) extrahiert und an GATC Konstanz zur Sequenzierung mit der PacBio RS II Technologie gesendet. Weiterhin wurde der Stamm am Zentrum für biologische Sicherheit am RKI Berlin mit der 454/Roche Technologie auf dem 454 GS FLX (Hoffmann–La Roche AG) und der Illumina Technologie auf dem HiScan 2000 (Illumina Inc.) sequenziert. Die bioinformatische Datenverarbeitung zur Erstellung von Genom-Contigs (Assembly) erfolgte durch GATC Konstanz. Die PacBio RS II Rohdaten wurden dort mit dem Online-Tool SMRT Portal (Pacific

Biosciences) auf ihre Qualität überprüft, um die Anzahl der nutzbaren Reads zu ermitteln. Diese Reads wurden anschließend mit den 454-Reads aus dem RKI Berlin und unter Zuhilfenahme des PacBio ToCA Skripts (Pacific Biosciences) korrigiert und anschließend mit dem Celera Assembler [116] zu Contigs zusammengefügt. Aus den 454-Daten wurde weiterhin ein separates Assembly mit dem *Assembler* Newbler (Hoffmann-La Roche AG) erstellt, welches als zweiter Qualitätskontrollschritt mit dem PacBio Assembly verglichen wurde. Die aus diesem Vorgang generierten Genom-Contigs wurden von GATC zurück übermittelt. Alle weiteren Datenverarbeitungsschritte wurden am RKI Wernigerode durchgeführt. Die am RKI Berlin generierten Illumina-Daten des Isolates 234/12 wurden mit dem Burrow-Wheeler Alignment-Programms BWA Version 0.6.2 [115] unter Einsatz des Smith-Waterman-Modules für Reads über 70 bp Länge und der Standardparameter auf die erhaltenen Contigs gemappt. Durch ein anschließendes Alignment der daraus resultierten Konsensussequenz in der Software Kodon (Applied Maths) konnten fünf Homopolymer-Sequenzierungsfehler identifiziert und korrigiert werden. Mittels Online-BLAST-Analysen wurden die Contigs in chromosomale und plasmidale Sequenzen unterschieden. Die so identifizierten chromosomalen Contigs wurden mittels der Software Mauve [119] orientiert und sortiert. Als Referenz zur Anordnung diente der *K. pneumoniae* Stamm NTUH-K2044 (Akzessionsnummer: NC\_012731) [144]. Die Identifikation von proteinkodierenden Sequenzen (CDS) und deren Annotation erfolgte mittels des RAST Annotationsservers [125].

### **2.2.2.3 De novo-Sequenzierung des Plasmid-Genoms des Referenzstammes**

Die mittels einer separaten Sequenzierung von Plasmid-DNA des Isolates 234/12 auf der MiSeq-Plattform (Illumina Inc.) generierten SequenzReads wurden mit der Software Spades [128] *de novo* assembliert. Dieser Datenverarbeitungsschritt wurden von Herrn René Wiegmann Rollet am RKI Wernigerode durchgeführt.

### **2.2.2.4 Mapping der Illumina Sequenz-Reads und Identifizierung von Punktmutationen**

Das Mapping der, mittels Illumina Technologie generierten, Sequenz-Reads erfolgte mittels des Burrow-Wheeler Alignment-Programms BWA, Version 0.6.2 [115] unter Einsatz des Smith-Waterman-Modules für Reads über 70 bp Länge und der Standardparameter. Als Referenz dienten die *de novo* sequenzierten, konkatinieren, korrigierten chromosomalen Contigs des Referenz-Stammes 234/12. Die produzierten Alignment-Dateien wurden mit der

Software Samtools, Version 0.1.18 (<http://sourceforge.net/projects/samtools/files/>) prozessiert und Punktmutationen (SNPs) im Vergleich zur Referenz mittels des Programmes Varscan, Version 2.3 [130] identifiziert (Parameter: Coverage  $\geq 8$ ; variant frequency  $\geq 0.75$ ; base quality  $\geq 15$ ). Die Software-Tools zum Mapping, zur Alignment-Prozessierung und SNP-Identifikation wurden in einer, von Herrn Matthias Steglich am RKI Wernigerode implementierten, Unix-basierten Pipeline kombiniert.

#### **2.2.2.5 Behandlung repetitiver Sequenzabschnitte und mobiler genetischer Elemente**

Kommen Sequenzabschnitte im Genom mehrfach vor, kann es an diesen Stellen zu Mapping-Fehlern und damit zur nicht korrekten Detektion von SNPs kommen. Aus diesem Grund wurden diese repetitiven Elemente aus den folgenden phylogenetischen Analysen ausgeschlossen. Hierzu wurde die Referenzsequenz mittels des in der Software Kodon enthaltenen Repeat Analyse Werkzeugs identifiziert. Diese Bereiche wurden anschließend für die weiterführenden phylogenetischen Analysen mittels eines Linux Shell-Skripts aus allen Sequenzen entfernt. Neben repetitiven Regionen stellen auch mobile genetische Elemente (MGEs) wie Prophagen, Transposons und Insertionselemente ein Problem dar. Diese MGE werden durch horizontalen Gentransfer übertragen und können zu einer Verzerrung des phylogenetischen Signals führen. Daher wurden alle SNPs manuell auf eine mögliche Lage innerhalb eines MGEs überprüft.

#### **2.2.2.6 Detektion von Prophagensequenzen**

Innerhalb des *de novo*-sequenzierten Referenzgenoms des Isolat 234/12 wurde das Onlinetool PHAST [123] zur Detektion und Annotation von Prophagensequenzen verwendet.

#### **2.2.2.7 Detektion und Behandlung von Rekombination**

Im bakteriellen Genom kann es durch Rekombinationsereignisse zu einer Anhäufung von Sequenzpolymorphismen kommen, welche jedoch nicht auf die Evolution des Bakterienstammes, sondern auf die Rekombination von DNA-Abschnitten zurückzuführen sind. Da auch diese Sequenzbereiche phylogenetische Berechnungen verzerren können wurde der in dieser Arbeit verwendete Datensatz auf Polymorphismen kontrolliert, welche weniger als 600 bp voneinander entfernt lagen. Diese SNPs wurden von den weiteren phylogenetischen Berechnungen ausgeschlossen.

### **2.2.2.8 Detektion homoplasischer Punktmutationen**

Bei Homoplasien handelt es sich um SNPs, welche nicht auf einen gemeinsamen Ursprung zurückzuführen sind. Sie sind entweder das Resultat homologer Rekombination oder aber konvergenter Evolution. Homoplasien innerhalb der untersuchten Ausbruchs isolate wurden mittels des Four-gamete-Test in der Software DnaSP Version 5 [117] identifiziert.

### **2.2.2.9 Einordnung von ST514 in die Populationsstruktur von *K. pneumoniae***

Die Position des Sequenztyps ST514 innerhalb der Populationsstruktur der *K. pneumoniae*-Sequenztypen wurde mittels der Software eBurst, Version 3 [118] unter Verwendung des Datensatzes der *K. pneumoniae* MLST-Datenbank analysiert (<http://www.pasteur.fr>).

## **2.2.3 Phylogenetische Analyse des *K. pneumoniae*-Ausbruchs**

Zur Analyse des *K. pneumoniae*-Ausbruchs wurden zwei unterschiedliche Verfahren phylogenetischer Berechnungen herangezogen.

### **2.2.3.1 Rekonstruktion eines Maximum Likelihood-Stammbaumes**

Bei der Maximum Likelihood-Analyse wird aus einem Sequenzalignment der Stammbaum ermittelt, welcher den höchsten Likelihood-Wert aufweist. Der Likelihood-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass die ermittelten Daten im Alignment aufgrund der Hypothese (Stammbaum und Evolutionsmodell) entstanden sein können. Die Berechnung eines Maximum Likelihood-Baumes wurde in dieser Arbeit mit dem PhyML-Modul des Programms Seaview Version 4.2.3 [127] durchgeführt. Da diese Analysen sehr rechenintensiv sind, wurde dazu ein Alignment verwendet, welches nur die variablen Positionen im Kerngenom (SNPs) des analysierten Sequenzdatensatzes enthielt.

### **2.2.3.2 Berechnung von Substitutionsrate und Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr**

Zur Berechnung der Substitutionsrate oder Evolutionsrate und der Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahren (TMRCA) des *K. pneumoniae*-Ausbruchsstammes wurde die Analysesoftware BEAST Version 1.7.4 [112] verwendet. BEAST beruht auf Bayes'scher Statistik und verwendet den Markov Chain Monte Carlo (MCMC)-Algorithmus. Für die Datierung von bakteriellen Divergenzzeitpunkten können in BEAST zur Kalibrierung der molekularen Uhr die Isolationsdaten der untersuchten Bakterienstämme herangezogen werden. Als Input für BEAST dient eine mit dem Programm BEAUti Version 1.7.4 [113]

erzeugte XML-Datei. Diese enthält neben dem Sequenzalignment mit den Isolationsdaten auch die Einstellungen zum Substitutionsmodell, zum Modell der molekularen Uhr und zu den *priors*. Die Einstellungen für die Berechnung sind in Tabelle 2.10 aufgeführt. Die Kettenlänge des MCMC-Laufes wurde mit  $3 \times 10^7$  Zyklen so gewählt, dass die *effective sample size* (ESS)-Parameter größer 200 sind. Zur richtigen Wahl des *clock models* wurde mittels der Software PAUP [122] ein Likelihood-Ratio-Test [145] durchgeführt. Bei diesem Test werden von PAUP Likelihood-Scores für Maximum-Likelihood-Bäume mit strikter und relaxierter molekularer Uhr ermittelt. Die statistische Signifikanz des Unterschiedes zwischen den ermittelten Likelihood-Scores wird mittels Chi-Quadrat-Test mit  $s-2$  Freiheitsgraden ( $s$ =Anzahl der verwendeten Genomsequenzen) ermittelt. So kann entschieden werden, ob die Hypothese einer strikten molekularen Uhr abgelehnt werden kann. Der Likelihood-Ratio-Test deutete darauf hin, dass die unterschiedlichen Astlängen im Maximum-Likelihood-Stammbaum aus variablen Substitutionsraten resultieren ( $p < 0,000001$ ). Daher wurde ein *relaxed clock*-Modell für die Kalibrierung der molekularen Uhr gewählt.

Zur Absicherung der Ergebnisse wurden drei unabhängige Berechnungen durchgeführt und die Output-Dateien mittels der Software Tracer [112] auf Konvergenz der Ergebnisse geprüft. Zur Validierung der Ergebnisse wurden zehn BEAST-Läufe durchgeführt, in denen die Erstnachweisdaten zufällig auf die Genomsequenzen des Datensatzes permutiert wurden. Des Weiteren wurde ein Lauf mit einem sogenannten *empty alignment* durchgeführt, bei dem der Datensatz nur die verwendeten Datumsangaben enthält, nicht aber die Sequenzdaten. Mittels dieser drei Schritte konnte gewährleistet werden, dass die Ergebnisse ein echtes zeitliches und phylogenetisches Signal enthalten und nicht lediglich durch die Wahl der *priors* zustande kamen.

**Tabelle 2.10: Einstellungen für Bayes'sche Analyse mit BEAST**

<b>Parameter</b>	<b>Einstellung</b>
<b>Site Model</b>	
Substitution Model	HKY
Base frequencies	Estimated
Site Heterogeneity Model	None
Partition into codon positions	Off
<b>Clock Model</b>	
Model	Lognormal relaxed clock (Uncorrelated)
Rate	1,00E-06
<b>Trees</b>	
Tree Prior	Constant size
<b>Priors</b>	Default
<b>Operators</b>	Default
<b>MCMC</b>	
Length of Chain	3,00E+07
Echo state to screen every	10 000
Log parameters every	1 000

### 2.2.3.3 Analyse der Übertragungswege während des Ausbruchgeschehens

Mittels der genetischen Verwandtschaftsverhältnisse der Ausbruchs isolate untereinander ist es möglich Rückschlüsse auf deren Transmissionsgeschichte zu ziehen. Um diese Verhältnisse genauer zu rekonstruieren, ist die Verwendung eines phylogenetischen Maximum-Likelihood-Trees (MLT), welcher die jüngsten gemeinsamen Vorfahren der Isolate rekonstruiert, nicht zielführend [146]. Im Gegensatz zum Maximum-Likelihood-Tree, ist es in einem Minimum-Spanning-Tree (MST) möglich, dass ancestrale Isolate interne Knotenpunkte besetzen und somit eine eventuelle Transmissionsgeschichte klarer erkannt werden kann. Die Rekonstruktion eines MST erfolgte mittels der Software Bionumerics (Applied Maths, Sint-Martens-Latem).



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung ambulanter und nosokomialer ESBL-produzierender *E. coli* aus dem Limbach Laborverbund

Im Rahmen einer Studie in Zusammenarbeit mit dem Limbach Laborverbund wurden von 29 mikrobiologischen Diagnostiklaboren im Zeitraum von Januar 2010 bis Oktober 2012 126 nosokomiale *E. coli*-Isolate (> 48 h nach Aufnahme isoliert) und 105 *E. coli*-Isolate aus dem ambulanten Bereich gesammelt. Diese wurden von den jeweiligen Laboren mittels Automaten systemen (Antimikrobielle Resistenzbestimmung) positiv auf die Produktion von ESBLs getestet.

##### 3.1.1 Allgemeine Charakterisierung der ambulanten ESBL-*E. coli*-Isolate

Insgesamt wurden von April 2011 bis März 2012 105 ESBL-positive *E. coli*-Isolate ambulanter Patienten von 23 mikrobiologischen Diagnostiklaboren eingesandt. Die Isolate wurden aus unterschiedlichen Materialien wie Urin (n=93; 88,6 %), Vaginalabstrichen (n=5; 4,8 %), Hautabstrichen (n=1), Nasenabstrichen (n=1), Ohrabstrichen (n=1), Rachenabstrichen (n=1), Sputum (n=1), Zungenabstrichen (n=1) sowie einer nicht bekannten Quelle gewonnen. Die eingesandten Isolate stammen vornehmlich von Patienten aus dem Westen bzw. Südwesten Deutschlands. Ihre genaue geographische Herkunft nach Postleitzahlbereichen ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Das durchschnittliche Alter der Patienten belief sich auf 59,8 Jahre. 77 % (n=77) der Isolate stammten von weiblichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 57,5 Jahren und 23 % (n=23) von männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 67,3 Jahren (Tabelle 3.1). Für fünf Isolate lagen keine Informationen zu Alter und Geschlecht der Patienten vor. Von elf Patienten lagen Information über eine Vorerkrankung vor, wegen der eine frühere Hospitalisierung nicht auszuschließen ist.

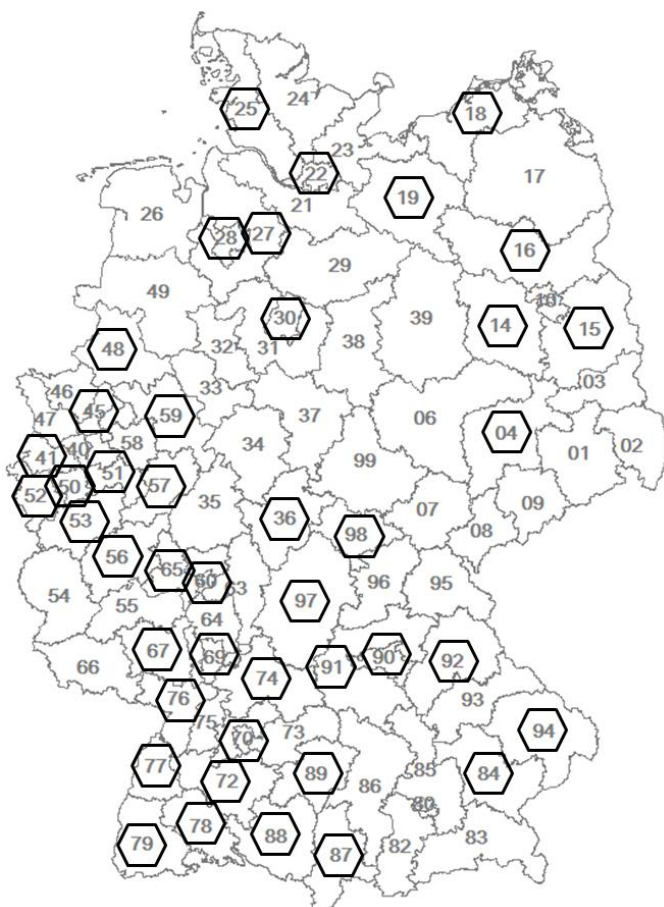


Abbildung 3.1: Geographische Herkunft der ambulanten Patienten mit ESBL-*E. coli* aus der Limbach-Laborstudie; nach den zweistelligen Postleitzahl-Bereichen

Tabelle 3.1: Altersgruppierung der ambulanten Patienten mit ESBL-*E. coli* aus der Limbach-Laborstudie

Altersgruppe in Jahren	weiblich		männlich	
	n	%	n	%
1-10	6	7,8	1	4,3
11-20	1	1,3	0	0,0
21-30	9	11,7	1	4,3
31-40	3	3,9	0	0,0
41-50	7	9,1	2	8,7
51-60	6	7,8	1	4,3
61-70	14	18,2	5	21,7
71-80	18	23,4	8	34,8
81-90	13	16,9	5	21,7
<b>Gesamt</b>	<b>77</b>		<b>23</b>	

---

### 3.1.2 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung

Die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung mittels Mikrobouillon-Verdünnungstest und Agar-Diffusionstest zeigte bei allen ambulanten Isolaten eine Resistenz gegenüber den getesteten Penicillinen Ampicillin und Mezlocillin. Gegenüber dem Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim waren 100 % aller Isolate resistent. Ebenso waren 68,6 % der ESBL-*E. coli* resistent gegen das Viertgenerations-Cephalosporin Cefepim oder zeigten einen verminderten Hemmhofdurchmesser im Agar-Diffusionstest (21-23 mm; 18,1 %; n=19). Gegen Cefoxitin zeigten 90,5 % der getesteten Isolate eine erhöhte MHK (2-16 mg/l) und 8,6 % (n=9) waren resistent. Des Weiteren konnte bei 75,2 % bzw. 80 % der Isolate eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Nalidixinsäure nachgewiesen werden. 75,2 % der Isolate ist somit der Status 3-MRGN (multiresistente gramnegative Stäbchen mit Resistenz gegen Acylureidopenicilline, Dritt- oder Viertgenerations-Cephalosporine und Fluorchinolone) nach den Richtlinien der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) zuzuweisen [82]. Die Resistenzraten für alle getesteten antimikrobiellen Substanzen können Tabelle 3.2 entnommen werden.

**Tabelle 3.2: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstesting der 105 ambulanten ESBL-*E. coli* aus der Limbach-Laborstudie**

Substanz	empfindlich		intermediar		resistent	
	n	%	n	%	n	%
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	105	100
Mezlocillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	105	100
<b>Cephalosporine</b>						
Cefepim <sup>1</sup>	14	13,3	19	18,1	72	68,6
Cefotaxim <sup>1</sup>	-	-	-	-	105	100
Cefoxitin <sup>2</sup>	1	1	95	90,5	9	8,6
Ceftazidim <sup>1</sup>	13	12,4	9	8,6	83	79
<b>Carbapeneme</b>						
Ertapenem <sup>1</sup>	98	93,3	7	6,7	-	-
Imipenem <sup>1</sup>	105	100	-	-	-	-
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	26	24,8	-	-	79	75,2
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	21	20	-	-	84	80
<b>Aminoglykoside</b>						
Amikacin <sup>1</sup>	88	83,8	11	10,5	6	5,7
Kanamycin <sup>2</sup>	52	49,5	3	2,9	50	47,6
Gentamicin <sup>1</sup>	66	62,9	6	5,7	33	31,4
<b>Phenicole</b>						
Chloramphenicol <sup>1</sup>	67	63,8	-	-	38	36,2
<b>Sulfonamide</b>						
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim <sup>1</sup>	32	30,5	-	-	73	69,5
<b>Tetrazykline</b>						
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	15	14,3	16	15,2	74	70,5

Interpretation der MHK und Hemmhofdurchmesser nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>

### 3.1.3 Molekulare Charakterisierung der ambulanten *E. coli*-Isolate der Limbach-Laborstudie

Die molekulare Charakterisierung mittels PCR und Sanger-Sequenzierung zeigte, dass in den ambulanten ESBL-*E. coli* der Limbach-Laborstudie die Klasse der CTX-M-ESBL mit 96 % (n=102) am häufigsten vertreten war. In dieser Gruppe war CTX-M-15 mit 51,4 % (n=54) die

häufigste ESBL-Variante gefolgt von CTX-M-1 (25,7 %; n= 27) und CTX-M-14 (6,7 %; n=7). Weitere ESBL-Typen, darunter weltweit seltene Varianten, wie CTX-M-8 und CTX-M-104, kamen nur in einzelnen Isolaten vor (Tabelle 3.3). In 37,1 % (n=39) der Isolate konnte das PMQR-Gen *aac(6')1b-cr* detektiert werden. Als weitere PMQR-Gene konnten *qnrA1* (1 %; n=1), *qnrB1* (1 %; n=1) und *qnrS1* (1 %; n=1) identifiziert werden.

In 31,4 % (n=32) der Isolate waren CTX-M-ESBL mit anderen  $\beta$ -Laktamasen, wie TEM-1, TEM-135 oder ESBL (SHV-12) assoziiert. In einem Fall kamen der ESBL-Typ SHV-12 und CTX-M-15 gemeinsam vor (Tabelle 3.4).

**Tabelle 3.3: Identifizierte ESBL-Typen ambulanter *E. coli*-Isolate der Limbach-Laborstudie;** n=105; in einem Isolat kamen die ESBL-Typen CTX-M-15 und SHV-12 gemeinsam vor

ESBL-Typ	n	%
CTX-M-15	54	51,4
CTX-M-1	27	25,7
CTX-M-14	7	6,7
CTX-M-27	4	3,8
CTX-M-55	3	2,9
SHV-12	3	2,9
CTX-M-9	2	1,9
CTX-M-104	1	1,0
CTX-M-24	1	1,0
CTX-M-3	1	1,0
CTX-M-32	1	1,0
CTX-M-8	1	1,0
TEM-52	1	1,0
<b>Gesamt</b>	<b>106</b>	<b>100</b>

**Tabelle 3.4: Mit anderen  $\beta$ -Laktamasen assoziierte ESBL-Gene in den ambulanten *E. coli*-Isolaten der Limbach-Laborstudie**

Genotyp	n
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	13
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	3
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	12
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-32</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM135</sub>	1
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<b>Gesamt</b>	<b>33</b>

Die Bestimmung der phylogenetischen Gruppen der ambulanten ESBL-*E. coli*-Isolate, welche den häufigsten ESBL-Typ CTX-M-15 produzieren, zeigte, dass 63 % (n=34) der Gruppe B2 und 22,2 % (n=12) der Gruppe D angehören. Die Isolate mit dem zweithäufigsten ESBL-Typ CTX-M-1 gehörten zu 33,3 % (n=9) zur Gruppe B1 und zu 33,3 % (n=9) und 22,2 % (n=6) zu den Gruppen A und B2 (Tabelle 3.5).

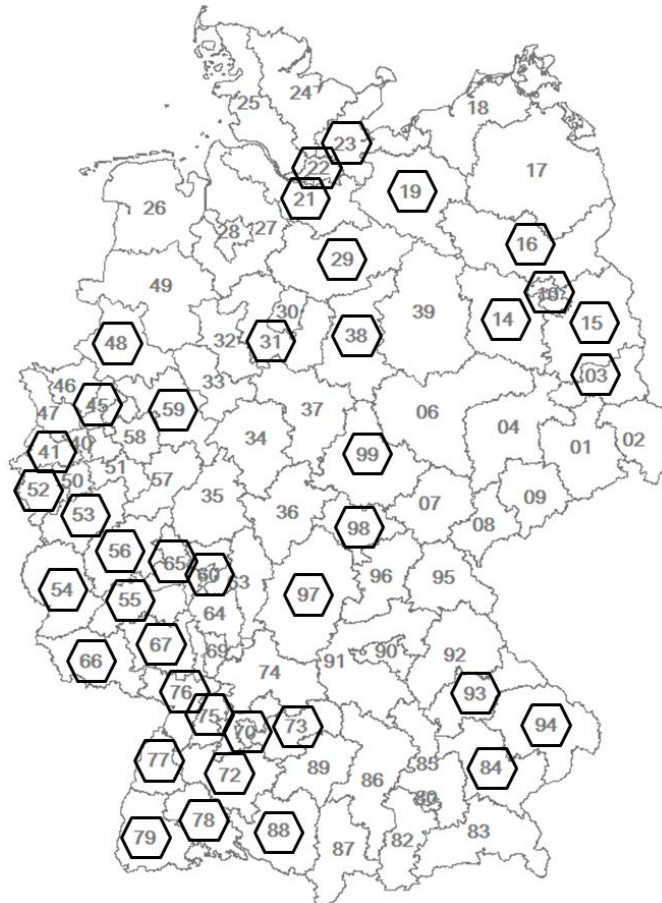
**Tabelle 3.5: Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der ambulanten *E. coli*-Isolate der Limbach-Laborstudie**

Phylogruppe	A		B1		B2		D		Gesamt
ESBL-Typ	n	%	n	%	n	%	n	%	
CTX-M-15	6	11,1	2	3,7	35	63,0	12	22,2	<b>55</b>
CTX-M-1	9	33,3	10	37,0	6	22,2	2	7,4	<b>27</b>
CTX-M-14	-	-	-	-	5	71,4	2	28,6	<b>7</b>
CTX-M-27	1	25,0	-	-	3	75,0	-	-	<b>4</b>
CTX-M-55	1	33,3	1	33,3	1	33,3	-	-	<b>3</b>
SHV-12	-	-	1	50,0	-	0,0	1	50,0	<b>2</b>
CTX-M-9	-	-	-	-	1	50,0	1	50,0	<b>2</b>
CTX-M-104	-	-	-	-	-	-	1	100,0	<b>1</b>
CTX-M-24	-	-	1	100,0	-	-	-	-	<b>1</b>
CTX-M-3	-	-	-	-	-	-	1	100,0	<b>1</b>
CTX-M-32	1	100,0	-	-	-	-	-	-	<b>1</b>
CTX-M-8	-	-	1	100,0	-	-	-	-	<b>1</b>
TEM-52	-	-	-	-	-	-	1	100,0	<b>1</b>
<b>Gesamt</b>	<b>18</b>		<b>16</b>		<b>50</b>		<b>21</b>		<b>105</b>

### 3.1.4 Allgemeine Charakterisierung der nosokomialen ESBL-*E. coli*-Isolate

Insgesamt wurden im Zeitraum von Januar 2010 bis Oktober 2012 von 29 mikrobiologischen Diagnostiklaboren 126 nosokomiale ESBL-positive *E. coli*-Isolate eingesandt. Die Isolate wurden aus unterschiedlichen Materialien wie Urin (n=65; 51,6 %), Blutkulturen (n=13; 10,3 %), Wundabstrichen (n=13; 10,3 %), Analabstrichen (n=5; 4 %), Trachealsekret (n=5; 4 %), Leistenabstrichen (n=4; 3,2 %), abdominalen Abstrichen (n=3; 2,4 %), Rachenabstrichen (n=2; 1,6 %), Stuhlproben (n=2; 1,6 %), Bauchabstrichen (n=2; 1,6 %), Bauchhöhlenabstrichen (n=2; 1,6 %) und Bronchialsekret (n=2; 1,6 %) gewonnen. Außerdem stammen einzelne Isolate aus einem sakralen Abszessabstrich, einem Dauerkatheter, einem Achselabstrich, einem Steißabstrich, einem Ulcusabstrich, einem Hautabstrich, Sputum sowie einer nicht bekannten Quelle. Die geographische Verteilung der Patientenherkunft nach Postleitzahlbereichen ist Abbildung 3.1 zu entnehmen. Von 12 Patienten lagen keine Informationen zu ihrer Herkunft vor. 46 % (n=58) der Isolate stammten von weiblichen

Patienten mit einem Durchschnittsalter von 77,0 Jahren und 54 % (n=61) von männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 67,2 Jahren (Tabelle 3.6). Für sieben Isolate lagen keine Informationen zu Alter und Geschlecht der Patienten vor.



**Abbildung 3.2: Geographische Herkunft der Patienten mit nosokomialen ESBL-*E. coli* aus der Limbach-Laborstudie; nach den zweistelligen Postleitzahl-Bereichen**

Tabelle 3.6: Altersgruppierung der nosokomialen Patienten der Limbach-Laborstudie

Altersgruppe in Jahren	weiblich		männlich	
	n	%	n	%
1-10	1	1,7	1	1,6
11-20	-	-	2	3,3
21-30	1	1,7	-	-
31-40	1	1,7	1	1,6
41-50	1	1,7	4	6,6
51-60	2	3,4	4	6,6
61-70	7	12,1	14	23,0
71-80	15	25,9	25	41,0
81-90	25	43,1	10	16,4
91-100	5	8,6	0	0,0
<b>Gesamt</b>	<b>58</b>		<b>61</b>	

### 3.1.5 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung

Die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung mittels Mikrobouillon-Verdünnungstest und Agar-Diffusionstest zeigte bei allen nosokomialen Isolaten eine Resistenz gegenüber den getesteten Penicillinen Ampicillin und Mezlocillin. Gegenüber dem Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim waren 97,6 % aller Isolate resistent. Zwei nicht Cefotaxim-resistente Isolate waren resistent gegenüber Ceftazidim. Ebenso waren 77 % der ESBL-*E. coli* resistent gegen das Viertgenerations-Cephalosporin Cefepim oder zeigten einen verminderten Hemmhofdurchmesser im Agar-Diffusionstest (21-23 mm; n=13; 10,3 %). Gegen Cefoxitin zeigten 89,7 % der getesteten Isolate eine erhöhte MHK (2-16 mg/l) und 7,9 % (n=10) waren resistent. Des Weiteren konnte bei 70,6 % bzw. 74,6 % der Isolate eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Nalidixinsäure nachgewiesen werden. 74,6 % der Isolate fielen unter die 3-MRGN-Definition der KRINKO. Die Resistenzraten für alle getesteten antimikrobiellen Substanzen können Tabelle 3.7 entnommen werden.



**Tabelle 3.7: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der 126 nosokomialen ESBL-*E. coli* aus der Limbach-Laborstudie**

Substanz	empfindlich		intermediär		resistent	
	n	%	n	%	n	%
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	126	100
Mezlocillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	126	100
<b>Cephalosporine</b>						
Cefepim <sup>1</sup>	16	12,7	13	10,3	97	77
Cefotaxim <sup>1</sup>	3	2,4	-	-	123	97,6
Cefoxitin <sup>2</sup>	3	2,4	113	89,7	10	7,9
Ceftazidim <sup>1</sup>	12	9,5	17	13,5	96	76,2
<b>Carbapeneme</b>						
Ertapenem <sup>1</sup>	120	95,2	6	4,8	-	-
Imipenem <sup>1</sup>	123	97,6	3	2,4	-	-
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	36	28,6	1	0,8	89	70,6
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	32	25,4	-	-	94	74,6
<b>Aminoglykoside</b>						
Amikacin <sup>1</sup>	112	88,9	7	5,6	4	3,2
Kanamycin <sup>2</sup>	70	55,6	8	6,3	48	38,1
Gentamicin <sup>1</sup>	85	67,5	4	3,2	37	29,4
<b>Phenicole</b>						
Chloramphenicol <sup>1</sup>	81	64,3	-	-	45	35,7
<b>Sulfonamide</b>						
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim <sup>1</sup>	38	30,2	-	-	89	70,6
<b>Tetrazykline</b>						
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	18	14,3	25	19,8	83	65,9

Interpretation der MHK und Hemmhofdurchmesser nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>

### 3.1.6 Molekulare Charakterisierung der nosokomialen *E. coli*-Isolate der Limbach-Laborstudie

Die Identifizierung der  $\beta$ -Laktamase-Gene mittels PCR und Sequenzierung bestätigte auch bei nosokomialen Isolaten der Limbach-Laborstudie den CTX-M-ESBL-Typ (94,4 %) mit den Varianten CTX-M-15 (49,2 %; n=62), CTX-M-1 (31 %; n=39) und CTX-M-14 (4,8 %; n=6) als am

häufigsten vorkommende ESBL-Klasse. Andere CTX-M-Typen sowie SHV- und TEM-ESBL konnten nur in vereinzelten Isolaten detektiert werden (Tabelle 3.8). In 33,3 % (n=42) der Isolate konnten ESBL gemeinsam mit der  $\beta$ -Laktamase TEM-1 nachgewiesen werden. Neben den detektierten  $\beta$ -Laktamasen konnten die PMQR-Gene *aac(6')1b-cr* (31 %, n=41) und *qnrS1* (6,3 %; n=8) identifiziert werden.

**Tabelle 3.8: Identifizierte ESBL-Typen in nosokomialen *E. coli*-Isolaten der Limbach Laborstudie; n=126**

ESBL-Typ	n	%
CTX-M-15	62	49,2
CTX-M-1	39	31,0
CTX-M-14	6	4,8
CTX-M-3	3	2,4
CTX-M-55	3	2,4
TEM-52	3	2,4
CTX-M-2	2	1,6
SHV-12	2	1,6
TEM-12	2	1,6
CTX-M-24	1	0,8
CTX-M-27	1	0,8
CTX-M-32	1	0,8
CTX-M-9	1	0,8
<b>Gesamt</b>	<b>126</b>	

**Tabelle 3.9: Mit anderen  $\beta$ -Laktamasen assoziierte *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene in den nosokomialen Isolaten der Limbach-Laborstudie**

Genotyp	n
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	20
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	17
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	2
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-24</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<b>Gesamt</b>	<b>42</b>

Die PCR-basierte Bestimmung der phylogenetischen Gruppen der nosokomialen ESBL-*E. coli* (Tabelle 3.10) zeigte, dass die Isolate mit dem häufigsten Genotyp CTX-M-15 zu 58 % (n=36) der Gruppe B2 und zu 21 % der Gruppe A zuzuordnen sind. Die Isolate mit dem zweithäufigsten ESBL-Typ CTX-M-1 gehörten zu je 28,2 % (n=11) zu den phylogenetischen Gruppen B1 und D.

**Tabelle 3.10: Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der nosokomialen *E. coli*-Isolate der Limbach-Laborstudie**

Phylogruppe	A		B1		B2		D		Gesamt
ESBL-Typ	n	%	n	%	n	%	n	%	
CTX-M-15	13	21,0	3	4,8	36	58,1	10	16,1	62
CTX-M-1	8	20,5	11	28,2	9	23,1	11	28,2	39
CTX-M-14	1	16,7	-	-	4	66,7	1	16,7	6
CTX-M-3	-	-	1	33,3	-	-	2	66,7	3
CTX-M-55	3	100,0	-	-	-	-	-	0,0	3
TEM-52	2	66,7	1	33,3	-	-	-	0,0	3
CTX-M-2	1	50,0	-	-	-	-	1	50,0	2
SHV-12	-	-	-	-	2	100,0	-	-	2
TEM-12	-	-	-	-	1	50,0	1	50,0	2
CTX-M-24	-	-	-	-	-	-	1	100,0	1
CTX-M-27	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1
CTX-M-32	-	-	1	100,0	-	-	-	-	1
CTX-M-9	-	-	-	-	1	100,0	-	-	1
<b>Gesamt</b>	<b>28</b>		<b>17</b>		<b>54</b>		<b>27</b>		<b>126</b>

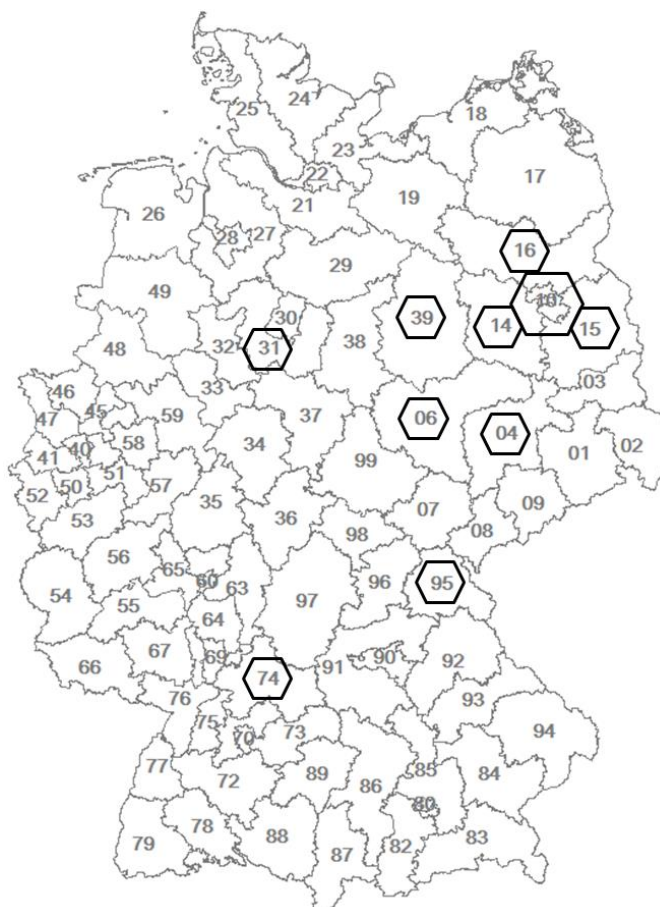
## 3.2 Charakterisierung ESBL-produzierender ambulanter *E. coli* aus einer Fall-Kontroll-Studie des Charité Universitätsklinikum Berlin

### 3.2.1 Allgemeine Charakterisierung der Studienisolate

Von den insgesamt 84 ESBL-*E. coli*-Isolaten stammten 85,7 % (n=72) von Patienten aus Berlin (66,7 %; n=56) und dem südlichen Brandenburg (19 %; n=16). Die 12 weiteren Isolate stammten von Patienten aus Sachsen, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen sowie Nordbayern und Baden-Württemberg (Abbildung 3.3). Die Geschlechterverteilung der beprobten Patienten belief sich auf 47,6 % weibliche und 52,4 % männliche Patienten und das mittlere Alter auf 59,3 Jahre. Sowohl bei den weiblichen, als auch den männlichen Patienten befand sich der Hauptteil der Patienten (> 65 %) in den Altersgruppen von 51-90 Jahre (Tabelle 3.11).

**Tabelle 3.11: Altersgruppierung der Patienten der Charité-Fall-Kontroll-Studie**

Altersgruppe in Jahren	weiblich		männlich	
	n	%	n	%
1-10	0	0,0	1	2,5
11-20	1	2,3	0	0
21-30	3	6,8	3	7,5
31-40	4	9,1	2	5
41-50	3	6,8	2	5
51-60	8	18,2	12	30
61-70	10	22,7	10	25
71-80	11	25,0	7	17,5
81-90	4	9,1	3	7,5
<b>Gesamt</b>	<b>44</b>		<b>40</b>	



**Abbildung 3.3: Geographische Herkunft der Patienten der Charité-Fall-Kontroll-Studie;** nach den zweistelligen Postleitzahl-Bereichen

### 3.2.2 Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung

Die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung mittels Mikrobouillon-Verdünnungstest und Agar-Diffusionstest zeigte bei allen ambulant erworbenen ESBL-*E. coli* Isolaten eine Resistenz gegenüber den getesteten Penicillinen Ampicillin und Mezlocillin. Gegenüber dem Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim waren 100 % aller Isolate resistent. Ebenso waren 71,4 % der ESBL-*E. coli* resistent gegen das Viertgenerations-Cephalosporin Cefepim oder zeigten einen verminderten Hemmhofdurchmesser im Agar-Diffusionstest (21-23 mm; n=11; 13,1 %). Gegen Cefoxitin zeigten 95,2 % der getesteten Isolate eine erhöhte MHK (2-16 mg/l) und 1,2 % waren resistent. Des Weiteren konnte bei 48,8 % bzw. 67,9 % der Isolate eine Resistenz gegenüber den Fluorchinolonen Ciprofloxacin und Nalidixinsäure nachgewiesen werden. Einem Anteil von 48,8 % der Isolate ist somit der Status 3-MRGN der KRINKO zuzuweisen. Die Resistenzraten für alle getesteten antimikrobiellen Substanzen können Tabelle 3.12 entnommen werden.

**Tabelle 3.12: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der 84 ambulanten ESBL-*E. coli* der Charité-Fall-Kontroll-Studie**

Substanz	empfindlich		intermediär		resistent	
	n	%	n	%	n	%
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	84	100
Mezlocillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	84	100
<b>Cephalosporine</b>						
Cefepim <sup>1</sup>	13	15,5	11	13,1	60	71,4
Cefotaxim <sup>1</sup>	-	-	-	-	84	100
Cefoxitin <sup>2</sup>	3	3,6	80	95,2	1	1,2
Ceftazidim <sup>1</sup>	16	19	19	22,6	49	58,3
<b>Carbapeneme</b>						
Ertapenem <sup>1</sup>	70	83,3	14	16,7	-	-
Imipenem <sup>1</sup>	84	100	-	-	-	-
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	40	47,6	3	3,6	41	48,8
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	27	32,1	-	-	57	67,9
<b>Aminoglykoside</b>						
Amikacin <sup>1</sup>	71	84,5	11	13,1	2	2,4
Kanamycin <sup>2</sup>	62	73,8	4	4,8	18	21,4
Gentamicin <sup>1</sup>	59	70,2	5	6	20	23,8
<b>Phenicole</b>						
Chloramphenicol <sup>1</sup>	62	73,8	-	-	22	26,2
<b>Sulfonamide</b>						
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim <sup>1</sup>	19	22,6	-	-	65	77,4
<b>Tetrazykline</b>						
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	9	10,7	22	26,2	53	63,1

Interpretation der MHK und Hemmhofdurchmesser nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>

### 3.2.3 Molekulare Charakterisierung

Die molekulare Charakterisierung der ESBL-*E. coli* aus der Fall-Kontroll-Studie des Charité Universitätsklinikum Berlin zeigte die Klasse der CTX-M-ESBL als die, mit 97,6 % (n=82), am häufigsten vertretene Enzymklasse. Hierbei waren *bla*<sub>CTX-M-1</sub> mit 42,9 % (n=36), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> mit 28,6 % (n=24) und *bla*<sub>CTX-M-14</sub> die drei meistdetektierten ESBL-Gene (Tabelle 3.13). Weitere

ESBL-Typen, wie CTX-M-2 (n=4), CTX-M-27 (n=3), CTX-M-3 (n=1), CTX-M-32 (n=1), CTX-M-55 (n=1), CTX-M-8 (n=1), SHV-12 (n=1) und TEM-52c (n=1) konnten nur in wenigen bis einzelnen Isolaten nachgewiesen werden.

In 21,4 % (n=18) der Fälle waren die detektierten ESBL mit dem  $\beta$ -Laktamase-Gen *bla*<sub>TEM-1</sub> assoziiert (Tabelle 3.14). Des Weiteren wurde in 14,3 % (n=12) der Isolate das PMQR-Gen *aac(6')1b-cr* nachgewiesen. Dieses Gen kam in allen Fällen in Verbindung mit dem *bla*<sub>CTX-M-15</sub> ESBL-Gen vor.

**Tabelle 3.13: Identifizierte ESBL-Typen in ambulanten *E. coli*-Isolaten der Charité-Fall-Kontroll-Studie**

ESBL-Typ	n	%
CTX-M-1	36	42,86
CTX-M-15	24	28,57
CTX-M-14	11	13,10
CTX-M-2	4	4,76
CTX-M-27	3	3,57
CTX-M-3	1	1,19
CTX-M-32	1	1,19
CTX-M-55	1	1,19
CTX-M-8	1	1,19
SHV-12	1	1,19
TEM-52	1	1,19
<b>Gesamt</b>	<b>84</b>	<b>100</b>

**Tabelle 3.14: *bla*<sub>TEM-1</sub>-assoziierte ESBL-Gene in den Isolaten der Charité-Fall-Kontroll-Studie**

Genotyp	n
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	9
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	2
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	3
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	2
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> + <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>	1
<b>Gesamt</b>	<b>18</b>

Die Bestimmung der phylogenetischen Gruppen der ESBL-*E. coli* zeigte, dass 36,1 % (n=13) der CTX-M-1 produzierenden Isolate zur Gruppe B1 und 30,6 % (n=11) zur Gruppe B2 gehörten. Die Isolate mit dem zweithäufigsten ESBL-Typ CTX-M-15 gehörten dagegen zu 62,5 % (n=15) der phylogenetischen Gruppe B2 an (Tabelle 3.15).

**Tabelle 3.15 : Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der *E. coli*-Isolate in der Charité-Fall-Kontroll-Studie**

Phylogruppe	A		B1		B2		D		Gesamt
ESBL-Typ	n	%	n	%	N	%	n	%	
CTX-M-1	6	16,7	13	36,1	11	30,6	6	16,7	36
CTX-M-15	3	12,5	2	8,3	15	62,5	4	16,7	24
CTX-M-14	-	-	2	18,2	4	36,4	5	45,5	11
CTX-M-2	2	50,0	2	50,0	-	-	-	-	4
CTX-M-27	-	-	-	-	3	100	-	-	3
CTX-M-3	-	-	-	-	1	100	-	-	1
CTX-M-32	-	-	1	100	-	-	-	-	1
CTX-M-55	1	100	-	-	-	-	-	-	1
CTX-M-8	-	-	1	100	-	-	-	-	1
SHV-12	1	100	-	-	-	-	-	-	1
TEM-52	-	-	-	-	-	-	1	100	1
<b>Gesamt</b>	<b>14</b>		<b>21</b>		<b>34</b>		<b>16</b>		<b>84</b>



### 3.3 Untersuchungen von $\beta$ -Laktamase-Bildung in Cephalosporin-resistenten *Salmonella enterica* in Deutschland 2005-2011

#### 3.3.1 Resistenz-Charakterisierung

Innerhalb eines Zeitraumes von 7 Jahren (2005-2011) konnten aus 23 771 in der Datenbank des NRZ für Salmonellen und andere Enteritiserreger vorhandenen *S. enterica* Isolaten 150 Isolate (0,6 %) mit einer Resistenz gegen Cefotaxim und/oder Ceftazidim ermittelt werden. Die mittlere Resistenzrate gegen Cefotaxim und/oder Ceftazidim aller *S. enterica*-Isolate in der NRZ-Datenbank betrug somit 0,62 % über den Gesamtzeitraum mit einem leichten Anstieg von 2005 (0,36 %) nach 2011 (0,84 %) (Tabelle 3.16), der jedoch nicht signifikant ist ( $p=0,181$ ; Spearman-Rang-Koeffizient 0,523). Insgesamt 14,0 % ( $n=21$ ) der 150 Isolate zeigten eine kombinierte Resistenz gegenüber Ampicillin, Chloramphenicol und Sulfmethoxazol/Trimethoprim. Weiterhin waren 8,7 % ( $n=13$ ) der Isolate resistent gegenüber Ciprofloxacin und fallen damit unter die 3-MRGN-Definition der KRINKO [82]. Die aus der NRZ-Datenbank ermittelten antimikrobiellen Resistenzraten sind in Tabelle 3.17 aufgeführt.

**Tabelle 3.16: Anzahl in das NRZ eingesandter Salmonellen und Häufigkeit ESBL/AmpC-produzierender Isolate**

Jahr	Isolate gesamt	Resistente Isolate (CTX und/oder CAZ*)	rel. Häufigkeit
2005	3 847	14	0,36 %
2006	3 616	10	0,36 %
2007	4 051	36	0,89 %
2008	3 384	21	0,62 %
2009	2 800	23	0,82 %
2010	3 469	21	0,6 %
2011	2 604	22	0,84 %
<b>Gesamt</b>	<b>23 771</b>	<b>147</b>	<b>0,62 %</b>

\*CTX, Cefotaxim; CAZ, Ceftazidim

**Tabelle 3.17: Resistenzraten der *Salmonella enterica*-Isolate mit Cefotaxim- und/oder Ceftazidim-Resistenz aus der Datenbank des NRZ für Salmonellen**

Substanz	resistent	
	n	%
<b>Penicilline</b>		
Ampicillin <sup>1</sup>	150	100
Mezlocillin <sup>1</sup>	150	100
<b>Cephalosporine</b>		
Cefotaxim <sup>1</sup>	144	96
Cefoxitin <sup>2</sup>	12	8
Ceftazidim <sup>1</sup>	149	99,3
<b>Fluorchinolone</b>		
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	13	8,7
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	30	20
<b>Aminoglykoside</b>		
Amikacin <sup>1</sup>	4	2,7
Kanamycin <sup>2</sup>	43	28,7
Gentamicin <sup>1</sup>	28	18,7
<b>Phenicol</b>		
Chloramphenicol <sup>1</sup>	31	20,7
<b>Sulfonamide</b>		
Sulfmethoxazol/Trimethoprim <sup>1</sup>	89	59,3
<b>Tetrazykline</b>		
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	90	60

Interpretation der MHK und Hemmhofdurchmesser nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>

Das am häufigsten bestimmte Serovar der untersuchten Isolate war *Salmonella* Typhimurium (48,7 %; n=73), darunter 23 Isolate der monophasischen Variante 4,[5],12:i:- (Tabelle 3.18), gefolgt von *Salmonella* Infantis (7,3 %; n=11), *Salmonella* Enteritidis (4,7 %; n=7) und *Salmonella* Kentucky (4,0 %; n=6). Eine komplette Auflistung aller untersuchten Isolate und deren Serovare können Tabelle 3.19 entnommen werden.

**Tabelle 3.18: Anzahl der ESBL-positiven, monophasischen *Salmonella* Typhimurium Variante 4,[5],12:i:- aus humanen Infektionen in Deutschland 2005-2011**

Phagentyp	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Gesamt	blaESBL/AmpC
DT193	-	2	2	3	3	2	3	15	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
DT120	-	-	-	-	-	1	-	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>
nicht typisierbar	-	-	-	-	-	-	6	6	<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> , n=3; <i>bla</i> <sub>SHV-12</sub> , n=2; <i>bla</i> <sub>TEM-52</sub> , n=1
RDNC*	-	-	-	-	-	1	-	1	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>
<b>Gesamt</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>9</b>	<b>23</b>	

\*RDNC – reagiert, aber entspricht keinem Phagentyp

### 3.3.2 Molekulare Charakterisierung

Mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung wurden verschiedene ESBL und AmpC-β-Laktamasen detektiert, welche in Tabelle 3.19 aufgeführt sind. Das am häufigsten bestimmte β-Laktamase-Gen war *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (60,7 %; n=91) gefolgt von *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (8,0 %; n=12) und *bla*<sub>SHV-12</sub> (7,3 %; n=11). In einzelnen Isolaten wurden *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (n=6) und *bla*<sub>CTX-M-8</sub> (n=1) gefunden. Das AmpC-β-Laktamase-Gen *bla*<sub>CMY-2</sub> wurde in 5,3 % (n=8) der Isolate in sieben unterschiedlichen Serovaren detektiert. Die β-Laktamase *bla*<sub>ACC-1</sub> konnte in sechs (4 %) *Salmonella* Bareilly-Isolaten identifiziert werden. Des Weiteren wurden verschiedene PMQR-Gene (*qnrB2*, n=6; *qnrS1*, n=2; *qnrA1*, n=2; *aac(6')-1b-cr*, n=1) in sieben *Salmonella* Typhimurium und einzelnen Isolaten der Serovare Agona, Kedougou und Typhi detektiert.

**Tabelle 3.19: Anzahl der ESBL und AmpC- $\beta$ -Laktamase-Gene in 150 Cephalosporin-resistenten *Salmonella enterica*-Isolaten in Deutschland 2005-2011**

<i>bla</i> <sub>ESBL/AmpC</sub>	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	Gesamt	Serovare
<i>bla</i> <sub>CTX-M-1</sub>	1	4	33	12	16	13	12	91	Typhimurium (n=56), Infantis (n=9), 13 andere Serovare (n=25)
<i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>	2	-	1	4	2	3	-	12	Typhimurium, Infantis, Kentucky, Bovismorbificans, Chester
<i>bla</i> <sub>SHV-12</sub>	1	4	-	-	-	3	3	11	Typhimurium, Concord, Rissen, Virchow
<i>bla</i> <sub>TEM-52</sub>	3	2	1	1	-	-	1	8	Subspecies 1, Paratyphi B var. Java, Typhimurium, Infantis, Corvallis
<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub>	-	-	-	2	3	1	2	8	Corvallis, Senftenberg, Anatum, Rissen, Thomson, Goldcoast, Kedougou
<i>bla</i> <sub>AAC-1</sub>	6	-	-	-	-	-	-	6	Bareilly
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	1	-	1	1	-	1	2	6	Typhi, Virchow, Concord, Havana, Newport
<i>bla</i> <sub>CTX-M-9</sub>	-	-	-	-	-	1	3	4	Kentucky, Typhimurium
<i>bla</i> <sub>SHV-2</sub>	-	-	1	-	-	-	-	1	Enteritidis
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	1	-	-	-	-	-	-	1	Virchow
<i>bla</i> <sub>CTX-M-3</sub>	-	-	-	-	1	-	-	1	Enteritidis
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	-	-	-	-	1	-	-	1	Newport
<b>Gesamt</b>	<b>15</b>	<b>10</b>	<b>37</b>	<b>20</b>	<b>23</b>	<b>22</b>	<b>23</b>	<b>150</b>	

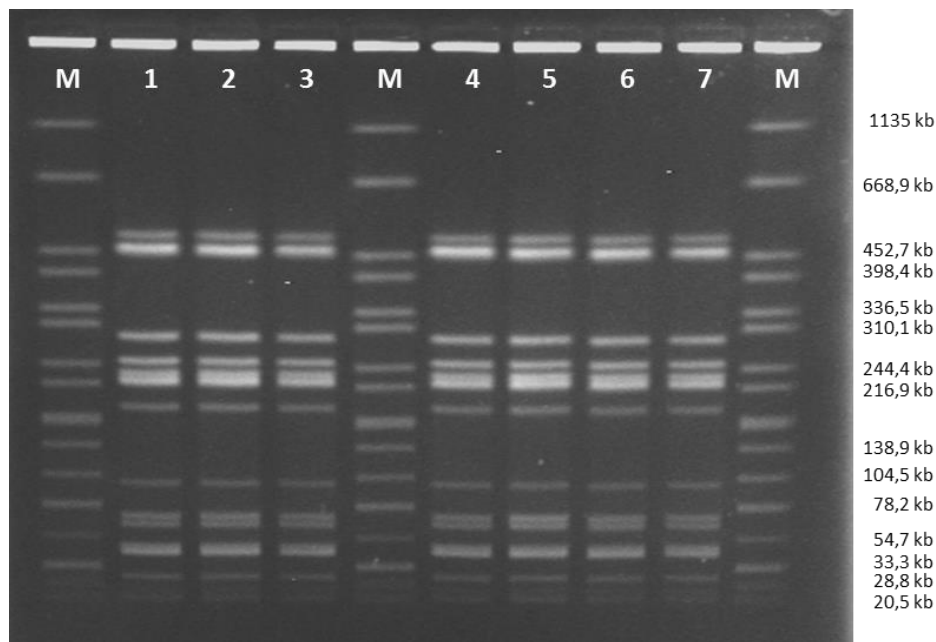
### 3.3.3 Gehäuftes Auftreten verschiedener *Salmonella* Serovare und Vergleich mit veterinärmedizinischen Isolaten

Mittels Makrorestriktionsanalysen (*Xba*I-PFGE) und Plasmiduntersuchungen (S1-PFGE) wurden zeitlich gehäuft auftretende *S. enterica*-Isolate verschiedener Serovare typisiert. Diese wurden anschließend mit Isolaten aus dem veterinärmedizinischen Bereich verglichen, welche vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Berlin zur Verfügung gestellt wurden.

Die *Xba*I-Makrorestriktion zeigte identische Restriktionsmuster für sechs AAC-1-positive *Salmonella* Bareilly-Isolate aus dem Jahr 2005. Ebenso die epidemiologischen Daten des NRZ deuten auf ein Ausbruchsgeschehen (klonale Verbreitung des AAC-1-positiven *Salmonella* Bareilly-Stammes) hin.

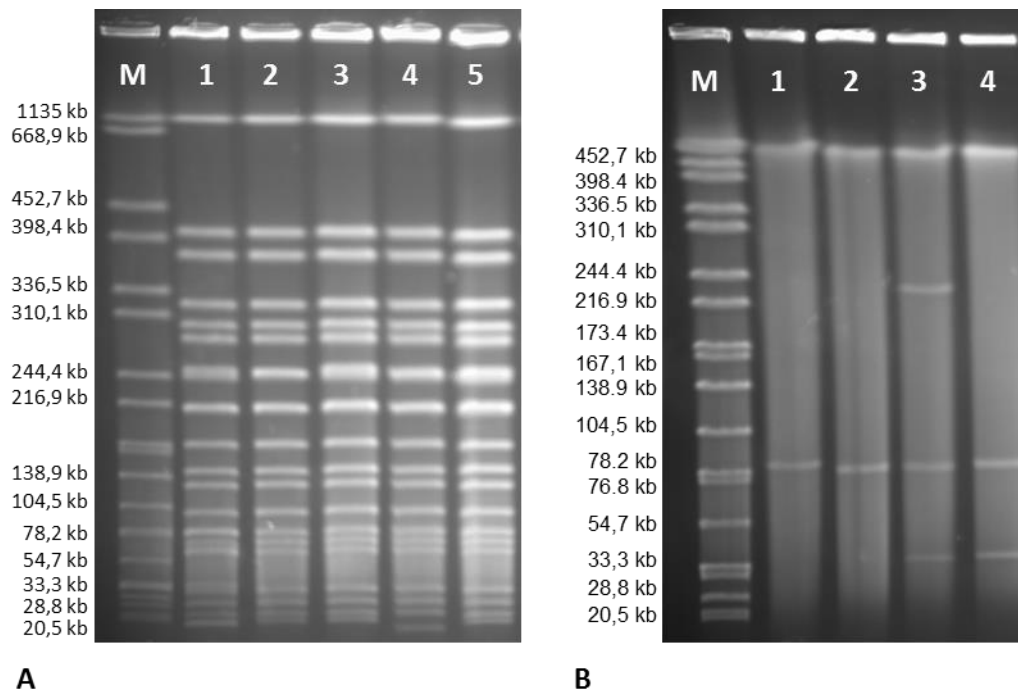
Als weiterer Ausbruchsstamm wurde ein CTX-M-1-produzierender *Salmonella* Typhimurium-Stamm des Phagentyps DT193 (22 Isolate) in 2007 identifiziert. Diese 22 Isolate wurden von verschiedenen Krankenhäusern in fünf Bundesländern (Bayern, Berlin-Brandenburg, Thüringen, Sachsen-Anhalt, Niedersachsen) eingesandt, was auf eine deutschlandweite

Verbreitung dieses Stammes hindeutet. Durch vergleichende *Xba*I-Makrorestriktionsuntersuchungen von Isolaten aus Nutztieren konnte der gleiche *Salmonella* Typhimurium DT193 Klon in drei Fäkalproben von Schweinen aus dem Jahr 2006 nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). Dieser *Salmonella* Typhimurium DT193 Klon enthielt neben dem *bla*<sub>CTX-M-1</sub> ESBL-Gen auch ein *bla*<sub>TEM-1</sub>  $\beta$ -Laktamase-Gen. Nachfolgende Konjugationsexperimente zeigten, dass die Gene *bla*<sub>CTX-M-1</sub> und *bla*<sub>TEM-1</sub> auf zwei konjugativen Plasmiden (35 kb und 120 kb) der Inkompatibilitätsgruppen IncN und IncFII kodiert sind.



**Abbildung 3.4:** *Xba*I Makrorestriktionsmuster von klinischen Isolaten des CTX-M-1-produzierenden *Salmonella* Typhimurium DT193-Ausbruchsstammes aus 2007 sowie eines CTX-M-1-produzierenden Isolates aus Schweinekot aus 2006; **Spur 1**, Bayern; **Spur 2**, Thüringen; **Spur 3**, Sachsen-Anhalt; **Spur 4**, Niedersachsen; **Spur 5**, Bayern; **Spur 6**, Berlin-Brandenburg; **Spur 7**, Berlin-Brandenburg 2006 (Schweinekot); **Spur M**, Größenstandard *S. Braenderup* H9812 (*Xba*I-Restriktion)

Das einzige, aus 2007 stammende, humane *Salmonella* Paratyphi B d-Tartrat-positive (dT+) Isolat mit einem *bla*<sub>TEM-52</sub> ESBL-Gen zeigte sowohl das gleiche *Xba*I-Restriktionsmuster als auch ein ca. 80 kb großes Plasmid der Inkompatibilitätsgruppe IncI1, wie vier aus Hühnerkot isolierte TEM-52-produzierende *Salmonella* Paratyphi B (dT+) im selben Jahr (Abbildung 3.5).



**Abbildung 3.5: Untersuchung des klinischen *Salmonella* Paratyphi B-Isolates (75/08); A) *Xba*I-Makrorestriktionsmuster-Vergleich mit veterinären Isolaten aus Hühnern aus dem Jahr 2007; Spur M, Größenmarker *S. Braenderup* H9812 (*Xba*I-Restriktion); Spur 1, Isolat 75/08 *Salmonella* Paratyphi human; Spur 2, Isolat 76/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; Spur 3 Isolat 77/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; Spur 4 Isolat 78/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; Spur 5 Isolat 415/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; B) S1-Plasmidanalyse; Spur M Größenmarker *S. Braenderup* H9812 (*Xba*I-Restriktion); Spur 1, Isolat 415/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; Spur 2, Transkonjugant Isolat 415/08 *Salmonella* Paratyphi Huhn; Spur 3, Isolat 75/08 *Salmonella* Paratyphi human; Spur 4, Transkonjugant Isolat 75/08 *Salmonella* Paratyphi human**

Bei weiteren vergleichenden Analysen ESBL-produzierender *Salmonella*-Stämme aus Mensch und Nutztier wurden zwei humane *Salmonella* Infantis Isolate mit *bla*<sub>TEM-52</sub> (IncI1 Plasmid, 80 kb) und *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (IncI1 Plasmid, 100 kb) identifiziert. Jedes dieser Isolate zeigte sowohl ein identisches Makrorestriktionsmuster, als auch die gleiche Anzahl und Größe von Plasmiden, wie ein Isolat vom Huhn aus demselben Zeitraum.

Weiterhin wurde das wiederholte Auftreten einzelner humaner ESBL-produzierender Stämme von *Salmonella* Anatum (zwei Isolate), *Salmonella* Kentucky (vier Isolate), *Salmonella* Kapemba (zwei Isolate) und *Salmonella* Infantis (vier Isolate) im humanmedizinischen Bereich beobachtet.

### 3.4 Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland

#### 3.4.1 Allgemeine Charakterisierung

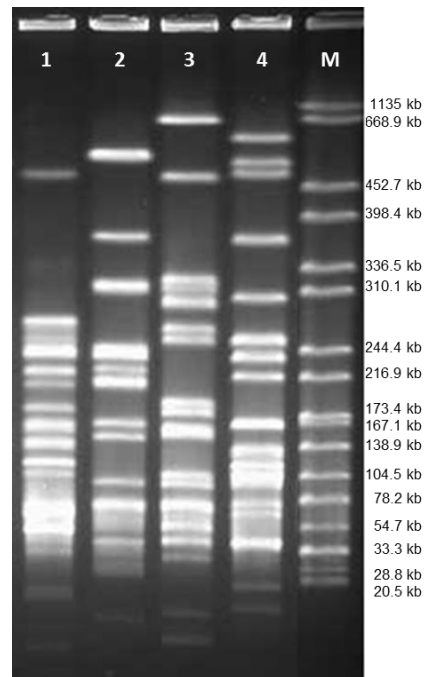
Im Rahmen der einzelnen Teilstudien dieser Arbeit wurden acht Enterobacteriaceae-Isolate aus verschiedenen Regionen Deutschlands identifiziert, welche die seltene, in Deutschland bis dato nicht beschriebene, ESBL-Variante CTX-M-8 produzieren. Dabei handelte es sich um Isolate der Spezies *E. coli* (n=1), *Salmonella enterica* (n=3; Serovare Newport, Agona und Anatum) und *Enterobacter aerogenes* (n=1). Unter diesen befinden sich sieben humane Isolate und ein Isolat aus Rinderhackfleisch, welches in Routineuntersuchungen des BfR identifiziert wurde (Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.20: CTX-M-8-positive Enterobacteriaceae-Isolate (2009-1012)**

Isolat	Jahr	Bundesland	Material	Infektion/Kolonisation	<i>E. coli</i> - Phylogruppe	PFGE- Typ
<i>E. coli</i> 1	2011	BB	Urin	Infektion (ambulant)	B1	1
<i>E. coli</i> 2	2011	BB	Rektalabstrich	Kolonisation	B1	2
<i>E. coli</i> 3	2011	BB	Rektalabstrich	Kolonisation	A	3
<i>E. coli</i> 4	2011	BB	Urin	Infektion (ambulant)	B1	4
<i>E. aerogenes</i>	2012	HE	Urin	Kolonisation	-	-
<i>S. Newport</i>	2009	TH	Stuhl	Infektion (ambulant)	-	-
<i>S. Agona</i>	2012	NI	Stuhl	Kolonisation	-	-
<i>S. Anatum</i>	2011	MV	Hackfleisch (Rind)	-	-	-

BB, Berlin-Brandenburg; HE, Hessen; TH, Thüringen; NI, Niedersachsen; MV, Mecklenburg-Vorpommern

Drei der vier *E. coli*-Isolate wurden als zugehörig zur phylogenetischen Gruppe B1 typisiert. Jedoch konnte mittels *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse zwischen diesen keine genetische Verwandtschaft festgestellt werden (Abbildung 3.6). Es handelte sich also um drei verschiedene *E. coli*-Stämme der Gruppe B1.



**Abbildung 3.6:** *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse der vier CTX-M-8-bildenden *E. coli*-Isolate; **Spur 1**, *E. coli* 1; **Spur 2**, *E. coli* 2; **Spur 3**, *E. coli* 3; **Spur 4**, *E. coli* 4; **M**, *S. Braenderup* H9812 (*Xba*I-Restriktion)

### 3.4.2 Antimikrobielle Empfindlichkeiten

Alle acht CTX-M-8-produzierenden *Enterobacteriaceae*-Isolate waren resistent gegenüber dem Drittgenerations-Cephalosporin Cefotaxim, blieben aber empfindlich gegenüber den Carbapenemen Imipenem und Meropenem. Drei *E. coli*-Isolate waren resistent gegen Sulfmethoxazol/Trimethoprim und Ciprofloxacin. Das *E. aerogenes*-Isolat war zusätzlich resistent gegenüber Cefoxitin und zeigte, wie auch zwei der *Salmonella*-Isolate, eine erhöhte MHK (1 mg/l) gegenüber Ciprofloxacin (Tabelle 3.21).



Tabelle 3.21: Antibiotikaresistenzen der CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Isolate

Substanz	<i>E. coli</i> 1	<i>E. coli</i> 2	<i>E. coli</i> 3	<i>E. coli</i> 4	<i>E.</i> <i>aerogenes</i>	<i>S.</i> Newport	<i>S.</i> Agona	<i>S.</i> Anatum
<b>Penicilline</b>								
Ampicillin <sup>1</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R
Mezlocillin <sup>1</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R
<b>Cephalosporine</b>								
Cefotaxim <sup>1</sup>	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitin <sup>2</sup>	I	I	I	I	R	S	I	I
Ceftazidim <sup>1</sup>	S	S	S	S	S	I	R	I
<b>Fluorchinolone</b>								
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	R	S	R	R	I	S	I	I
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	R	S	R	R	R	S	R	R
<b>Aminoglykoside</b>								
Amikacin <sup>1</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamycin <sup>2</sup>	S	R	S	S	S	S	S	S
Gentamicin <sup>1</sup>	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Phenicole</b>								
Chloramphenicol <sup>1</sup>	R	R	S	R	R	S	R	R
<b>Sulfonamide</b>								
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim <sup>1</sup>	R	R	S	R	S	S	S	S
<b>Tetrazykline</b>								
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	R	R	R	R	R	I	I	I

Interpretation der MHK und Hemmhofdurchmesser nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>; S, empfindlich; I, intermediär; R, resistent

### 3.4.3 Resistenzgene und Plasmide

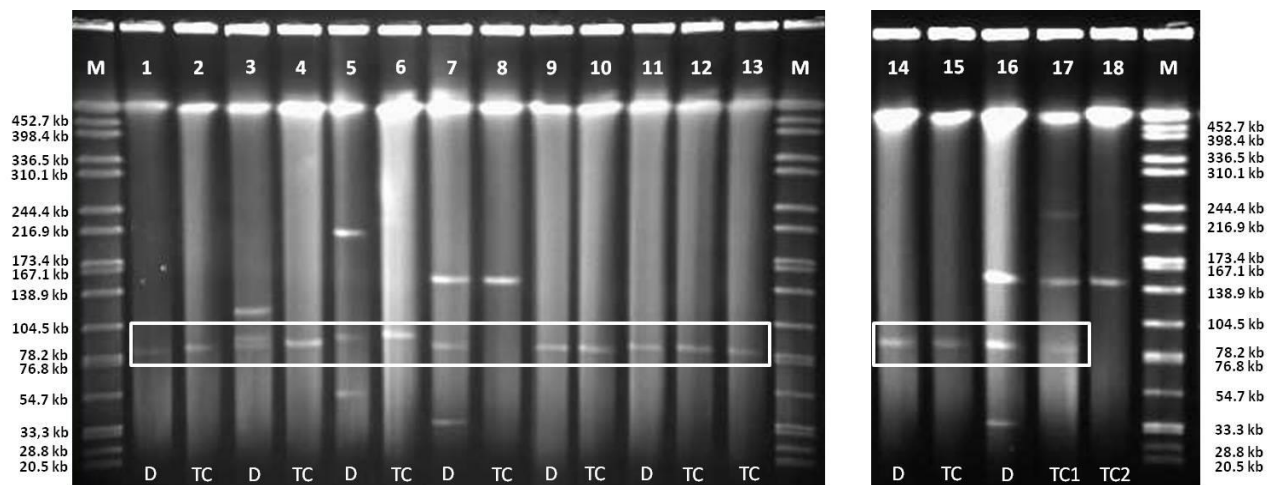
Das *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-Gen wurde mittels PCR und anschließender Sanger-Sequenzierung in allen acht Isolaten bestätigt. In zwei *E. coli*-Isolaten konnten zusätzlich jeweils die  $\beta$ -Laktamase-Gene *bla*<sub>TEM-135</sub> und *bla*<sub>TEM-1</sub> nachgewiesen werden. Ein Test der Isolate auf die PMQR-Gene *qnrA/B/C/D/S* und *aac(6')1b-cr* verblieb negativ. Mittels Konjugation im Flüssigmedium konnte das *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-Gen aus allen acht Isolaten in einen *E. coli* K12J53-Rezipientenstamm übertragen werden. Die übertragenen Plasmide hatten eine Größe von ca. 80-85 kb und gehörten zur Inkompatibilitätsgruppe IncI1. Da die erstellten Transkonjuganten ausschließlich Resistenzen gegenüber Ampicillin und Cefotaxim zeigten, ist davon

auszugehen, dass sich keine weiteren Resistenzdeterminanten auf dem *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmid befinden. Weitere Plasmiduntersuchungen mittels S1-Nuklease-Verdau und PFGE zeigten zusätzliche Plasmide in drei Donor-*E. coli*-Isolaten. In einem Fall wurde ein 140 kb *bla*<sub>TEM-1</sub>-tragendes Plasmid gleichzeitig mit dem *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmid konjugativ übertragen (Tabelle 3.22/Abbildung 3.7).

**Tabelle 3.22:  $\beta$ -Laktamasen und Plasmidcharakteristika der untersuchten CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Stämme**

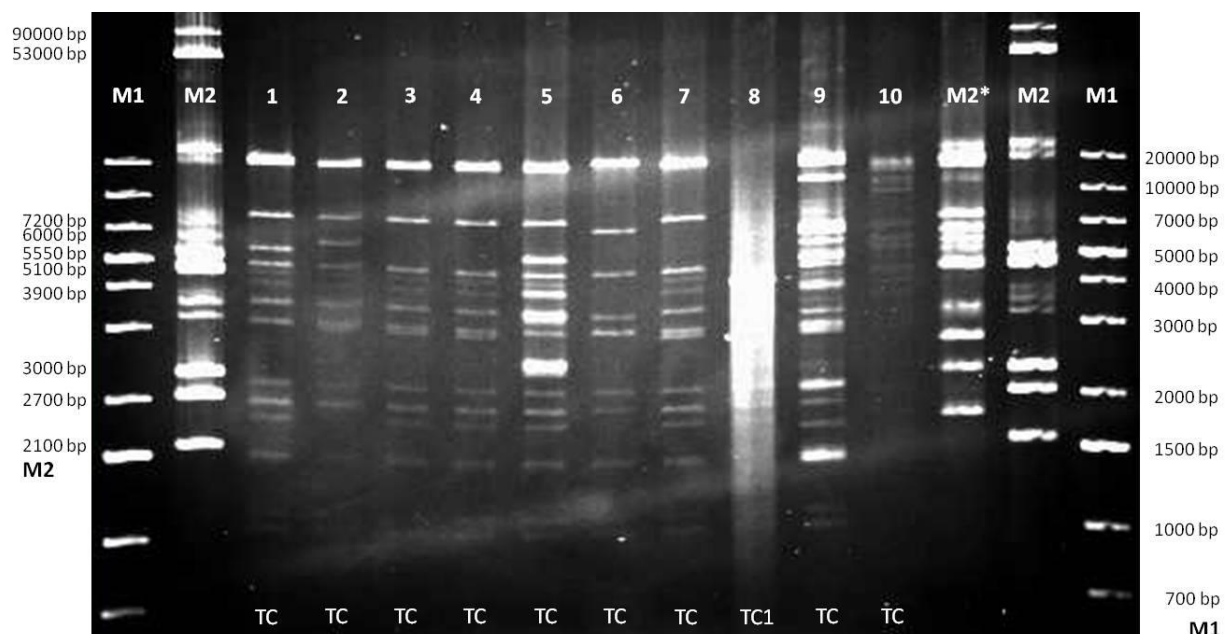
Isolat	$\beta$ -Laktamasen	<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> -Plasmid (replicon type, ST <sup>a</sup> )	Weitere Plasmide
<i>E. coli</i> 1	CTX-M-8, TEM-135	85 kb (IncI1, ST113)	5.5 kb, 55 kb, 210 kb
<i>E. coli</i> 2	CTX-M-8, TEM-1	80 kb (IncI1, ST113)	3.3 kb
<i>E. coli</i> 3	CTX-M-8, TEM-1	80 kb (IncI1, ST114)	90 kb, 120 kb
<i>E. coli</i> 4	CTX-M-8, TEM-1	80 kb (IncI1, ST113)	4 kb, 33 kb, 140 kb <sup>b</sup>
<i>E. aerogenes</i>	CTX-M-8	80 kb (IncI1, ST113)	-
<i>S. Newport</i>	CTX-M-8	80 kb (IncI1, ST113)	4.5 kb
<i>S. Agona</i>	CTX-M-8	80 kb (IncI1, ST115)	-
<i>S. Anatum</i>	CTX-M-8	80 kb (IncI1, ST113)	3.3 kb, 4 kb

<sup>a</sup>pMLST—IncI1 loci ST113: *repI* (1), *ardA* (2), *trbA* (5), *sogS* (10) und *pilL* (10); IncI1 loci ST114: *repI* (1), *ardA* (2), *trbA* (8), *sogS* (10) und *pilL* (3); IncI1 loci ST115: *repI* (1), *ardA* (4), *trbA* (5), *sogS* (10) und *pilL* (10); <sup>b</sup>Konjugatives Plasmid der IncFII/FIB-Gruppe mit *bla*<sub>TEM-1</sub>



**Abbildung 3.7: S1-Nuklease-Verdau der Plasmide der CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Stämme; Donor (D) und Transkonjuganten (TC); Spur M, *S. Braenderup* H9812 (*Xba*I-Restriktion); Spur 1, *E. coli* 2 TEM-1 + CTX-M-8; Spur 2, *E. coli* 2 Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 3, *E. coli* 3 TEM-1 + CTX-M-8; Spur 4, *E. coli* 3 Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 5, *E. coli* 1 TEM-135 + CTX-M-8; Spur 6, *E. coli* 1 Transkonjugant CTX-M-8 (85 kb, IncI1); Spur 7, *E. coli* 4 TEM-1 + CTX-M-8; Spur 8, *E. coli* 4 Transkonjugant TEM-1 (140 kb, FII/FIB); Spur 9, *E. aerogenes* CTX-M-8; Spur 10, *E. aerogenes* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 11, *S. Newport* CTX-M-8; Spur 12, *S. Newport* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 13, *S. Agona* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 14, *S. Anatum* CTX-M-8; Spur 15, *S. Anatum* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1); Spur 16, *E. coli* 4 CTX-M-8 + TEM-1; Spur 17, *E. coli* 4 Transkonjugant TC1 TEM-1 + CTX-M-8 (140 kb, IncFII/FIB; 80 kb IncI1); Spur 18, *E. coli* 4 Transkonjugant TC2 TEM-1 (140 kb, FII/FIB). Plasmide mit *bla*<sub>CTX-M-8</sub> sind eingerahmt.**

Die weitere Subtypisierung der *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmide mittels Plasmid Multilocus Sequence Typing (pMLST) ergab drei IncI1-Subtypen. Sechs der acht *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmide konnten dem gleichen Plasmid-Sequenztyp ST113 mit den Allelen *repI1* (1), *ardA* (2), *trbA* (5), *sogS* (10) und *pilL* (10) zugeordnet werden, welcher bis dato nicht in der pMLST Datenbank (<http://pubmlst.org/plasmid/>) enthalten war und deshalb neu hinzugefügt wurde. Das *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragende Plasmid ST115 des *Salmonella* Agona-Isolates unterschied sich nur in einem Allel vom Sequenztyp ST113 (*ardA* (4) statt *ardA* (2), durch ein Nukleotid Unterschied). Das *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-positive Plasmid ST114 mit den Allelen *repI1* (1), *ardA* (2), *trbA* (8), *sogS*(10) und *pilL* (3) des *E. coli* 3-Isolates entsprach in drei von fünf Loci dem Sequenztyp ST113 (Tabelle 3.22). Ergänzende RFLP-Analysen mittels *EcoRI*-Verdau zeigten nur geringe Unterschiede (zwei bis vier Banden) zwischen den Plasmiden der Sequenztypen ST113, ST114, ST115, was ihre nahe genetische Verwandtschaft bestätigt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8: *EcoRI*-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) der *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmide der *E. coli* K12J53 Transkonjuganten (TC); Spur M1, DNA Größenmarker 1 kb plus Gene Ruler™; Spur M2, Plasmidstandard *E. coli* R222 und *E. coli* V517 (*EcoRI*-verdaut); Spur 1, *E. coli* 1 Transkonjugant CTX-M-8 (85 kb, IncI1, ST113); Spur 2, *E. coli* 2 Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST113); Spur 3, *E. aerogenes* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST113); Spur 4, *S. Newport* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST113); Spur 5, *S. Anatum* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST113); Spur 6, *E. coli* 3 Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST114); Spur 7, *S. Agona* Transkonjugant CTX-M-8 (80 kb, IncI1, ST115); Spur 8, *E. coli* 4 Transkonjugant TC1 TEM-1 + CTX-M-8 (140 kb, IncFII/FIB; 80 kb IncI1, ST113); Spur 9, Kontrolle *E. coli* 93/11 Transkonjugant CTX-M-15 + TEM-1 (80 kb, IncI1, ST31); Spur 10, Kontrolle *K. oxytoca* 91/13 Transkonjugant VIM-1 (260 kb, IncH)**

### 3.5 Untersuchung des Ausbruchs ESBL-produzierender *K. pneumoniae* auf einer neonatologischen Intensivstation

#### 3.5.1 Ausbruchsverlauf

Am 1. November 2011 wurde das Robert Koch-Institut um Hilfe bei den Ermittlungen zu einem Ausbruch ESBL-produzierender *K. pneumoniae* auf einer neonatologischen Station eines Krankenhauses der Maximalversorgung mit 960 Betten in Bremen gebeten. Die pädiatrische Klinik, in welcher sich die vom Ausbruch betroffene Station befand, verfügt über 160 Betten und betreut 11 000 stationäre und ambulante Patienten pro Jahr. Die betroffenen Patienten befanden sich auf einer neonatologischen Intensivstation nahe dem Kreissaal, einer Kinder-Intensivstation und einer Rooming-in-Einheit, auf der Mütter und Kinder gemeinsam untergebracht sind.

Zum Zeitpunkt des Beginns der Untersuchungen des RKI waren in 15 Fällen Kolonisationen oder Infektionen mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* bei Neonaten identifiziert worden und drei von diesen waren an den Folgen verstorben [104]. Ein Team, bestehend aus Krankenhauspersonal und Mitarbeitern des lokalen Gesundheitsamtes, hatte bis dahin an einer Eindämmung des Ausbruchs gearbeitet. Als jedoch nach einer vierwöchigen Phase, in der keine neuen Fälle auftraten, wieder Infektionen mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* festgestellt wurden, wurde ein Team des RKI Berlin zu den Ermittlungen zum Ausbruch hinzugezogen.

Am 2. November 2011 wurde die Aufnahme neuer Patienten auf die neonatologische Intensivstation gestoppt. Ab dem 5. November 2011 wurde die Station als Maßnahme der Ausbruchskontrolle teilweise renoviert. Im Zuge dessen wurden vom 3. November 2011 an alle Neonaten auf die ehemalige Kinder-Chirurgie-Station verlegt, dort behandelt und wenn nötig isoliert. Nach der Renovierung wurde die Station am 9. Januar 2012 wieder eröffnet. Nachdem jedoch ab dem 21. Februar 2012 neue Fälle auftraten wurde sie am 28. Februar 2012 endgültig geschlossen und ist bis heute (April 2014) nicht wieder eröffnet worden.

Im Rahmen der mikrobiologischen Untersuchungen auf der betroffenen Station wurden Fälle von ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* vom 1. Januar 2009 bis zum November 2011 retrospektiv in der mikrobiologischen Datenbank des Krankenhauses gesucht. Waren die zugehörigen Isolate noch existent, wurde ihre Verbindung zum Ausbruch epidemiologisch

und molekularbiologisch untersucht. Insgesamt wurden in 2009 42 Fälle, in 2010 42 Fälle und bis zum November 2011 43 Fälle ESBL-produzierender *K. pneumoniae* identifiziert. Ab dem Januar 2012 wurden alle Patienten der pädiatrischen Klinik zum Zwecke einer verstärkten klinischen Überwachung bei Einlieferung auf die Station, und anschließend zweimal pro Woche, perianal abgestrichen und auf eine Kolonisation mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* überprüft. Weiterhin wurden im November 2011 328 Mitglieder des Krankenhauspersonals mittels perianalem Abstrich auf eine Besiedelung mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* getestet. Dieses Screening wurde im Februar 2012 durch perianale Abstriche und Rachenabstriche wiederholt. In keiner dieser Screening-Untersuchungen am Personal konnten jedoch ESBL-produzierende *K. pneumoniae* nachgewiesen werden. Bei Untersuchungen der Umgebung der Patienten wurden über 350 Proben genommen und untersucht. Beprobt wurden alle vom Ausbruch betroffenen pädiatrischen Stationen, der Kreissaal und die Entbindungsstation. Im Rahmen dieser Umweltuntersuchungen wurden in fünf Fällen Ausbruch-assoziierte ESBL-bildende *K. pneumoniae* detektiert. Sämtliche dieser im Vorangegangenen beschriebenen Untersuchungen wurden vom Ausbruchs-Interventionsteam des RKI Berlin vor Ort in Bremen durchgeführt [85].

Alle in Verbindung mit dem Ausbruch vermuteten ESBL-*K. pneumoniae*-Isolate wurden nach ihrem Fund an das Nationale Referenzzentrum für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum geschickt und dort mittels *Xba*I-Makrorestriktionsanalyse auf ihre genetische Verwandtschaft hin untersucht. Insgesamt 46 Isolate konnten als Ausbruch identifiziert werden. Isolate welche, weniger als drei Banden Unterschied im Makrorestriktionsmuster aufwiesen, wurden dem Pulsotyp 1 zugeordnet. Die einzelnen einmaligen Bandenmuster wurden in die Subtypen 1-1 bis 1-13 unterschieden. Weiterhin wurde der Ausbruchsstamm am NRZ als *K. pneumoniae* Sequenztyp ST514, Kapseltyp 33 identifiziert. Ebenfalls konnten mittels PCR und Sequenzierung die  $\beta$ -Laktamase-Gene *bla*<sub>TEM-1</sub> und *bla*<sub>SHV-63</sub> sowie das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> festgestellt werden.

### 3.5.2 Auswahl der Isolate für die Ganzgenom-Sequenzierung

In dieser Arbeit wurden insgesamt 46 der, aus den beschriebenen Untersuchungen in Bremen gewonnenen, *K. pneumoniae*-Isolate für eine Ganzgenom-Sequenzierung ausgewählt (Tabelle 3.23). Unter diesen befanden sich 38 *K. pneumoniae*-Isolate von 31

Patienten, die zuvor dem Ausbruchsstamm zugeordnet werden konnten. Darunter befand sich auch ein Isolat von 2009, welches innerhalb der retrospektiven Fallsuche in der mikrobiologischen Datenbank des Klinikums identifiziert worden war. Des Weiteren wurden zwei Patientenisolat ausgewählt, welche aus derselben Klinik stammten, jedoch anderen Sequenztypen angehörten (Isolate 255/12, ST280; 266/12, ST336; Tabelle 3.23). Außerdem wurden die bereits erwähnten fünf Ausbruch-assoziierten Umweltisolate sowie ein ST514-*K. pneumoniae*-Isolat aus Polen von 1996, welches von Dr. M. Gniadkowski und Dr. J. Fiett vom National Medicines Institute in Warschau, Polen zur Verfügung gestellt wurde, zur Ganzgenom-Sequenzierung ausgewählt (Isolat 316/12; Tabelle 3.23).

**Tabelle 3.23: Liste der in epidemiologisch bestätigten Patienten und sequenzierten *K. pneumoniae*-Stämme**

Patient	Isolat-ID	Nachweisdatum	Material	PFGE-Typ
Patient 01	267/12	2009	Trachelasekret	1-9
Patient 02	256/12	14.11.2011	Rektalabstrich	1-2
Patient 03	261/12	30.11.2011	Rektalabstrich	1-8
Patient 04	257/12	12.08.2011	Magensaft	1-8
Patient 06	274/12	17.06.2011	Trachelasekret	1-12
Patient 08	309/12	05.12.2011	Rektalabstrich	1-1
Patient 10	260/12	30.11.2011	Rektalabstrich	1-2
Patient 12-1	233/12	22.07.2011	Trachelasekret	1-2
Patient 12-2	307/12	07.12.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 14	234/12	07.08.2011	Blutkultur	1-1
Patient 15	259/12	28.11.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 16-1	232/12	30.08.2011	Blutkultur	1-2
Patient 16-2	248/12	26.10.2011	Blutkultur	1-1
Patient 16-3	247/12	03.11.2011	unbekannt	1-2
Patient 17-1	251/12	31.10.2011	Rachenabstrich	1-2
Patient 17-2	300/12	08.03.2012	Kombiabstrich	1-3
Patient 18	236/12	07.09.2011	Blutkultur	1-6
Patient 19	254/12	10.11.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 20	262/12	22.12.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 21	250/12	05.11.2011	Rektalabstrich	1-2
Patient 22	240/12	18.10.2011	Nasalabstrich	1-1
Patient 23	243/12	25.10.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 24	239/12	15.10.2011	Leistenabstrich	1-1
Patient 26	237/12	12.10.2011	Blutkultur	1-7
Patient 27	238/12	13.10.2011	Blutkultur	1-1
Patient 28	242/12	25.10.2011	Katheterspitze	1-2
Patient 29-1	244/12	20.10.2011	Sputum	1-2
Patient 29-2	275/12	09.02.2012	Rektalabstrich	1-13
Patient 30	241/12	25.10.2011	Rektalabstrich	1-3
Patient 31	246/12	25.10.2011	Kombiabstrich	1-3
Patient 32	268/12	21.02.2012	Rachenabstrich	1-10

Patient 33	269/12	21.02.2012	Kombiabstrich	1-10
Patient 34-1	271/12	22.02.2012	Kombiabstrich	1-10
Patient 34-2	392/12	25.05.2012	unbekannt	1-10
Patient 35-1	272/12	27.02.2012	Kombiabstrich	1-11
Patient 35-2	276/12	02.03.2012	Blutkultur	1-11
Patient 36	273/12	27.02.2012	Kombiabstrich	1-1
Patient 37	373/12	10.05.2012	Kombiabstrich	1-1
Umgebung 01	229/12	16.09.2011	Umgebungsabstrich	1-4
Umgebung 02	230/12	16.09.2011	Umgebungsabstrich	1-1
Umgebung 03	231/12	16.09.2011	Umgebungsabstrich	1-5
Umgebung 04	310/12	28.02.2012	Umgebungsabstrich	1-2
Umgebung 05	315/12	09.03.2012	Umgebungsabstrich	1-15
Neonat, Wroclaw, Polen*	316/12	1996	unbekannt	-
Outgroup 01**	255/12	11.01.2012	unbekannt	4
Outgroup 02**	266/12	11.01.2012	unbekannt	7

Von Patienten 12, 16, 17, 29, 34, 35 lagen mehr als ein Isolat vor; PFGE-Typen ermittelt aus *Xba*I-Makrorestriktion; \*Isolat 316/12 zu Verfügung gestellt von Dr. M. Gniadkowski und Dr. J. Fielt, National Medicines Institute in Warschau, Polen; \*\*Isolate, die zur Ermittlung der Wurzel eines phylogenetischen Baumes verwendet wurden

### 3.5.3 Charakterisierung des Ausbruchsstammes

Mittels Extraktion der MLST-Loci aus den Ganzgenomdaten konnte der Sequenztyp ST514 des Ausbruchsstammes bestätigt werden. Dieser ST wurde in Deutschland bisher noch nicht beschrieben. Seine erste Beschreibung stammt aus dem Jahr 1996, als er aus zwei neonatologischen Patienten in einem polnischen Universitätsklinikum isoliert wurde [147]. Analysen der MLST-Datenbank des Institut Pasteur, Paris zeigten, dass ST514 zur klonalen Gruppe 163 gehört, welche eine Gruppe nahverwandter STs im klonalen Komplex 23 darstellt [148].

Mittels PCR und Sequenzierung konnten im Ausbruchsstamm das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, die  $\beta$ -Laktamase-Gene *bla*<sub>TEM-1</sub> und *bla*<sub>SHV-63</sub> bestätigt werden.

Alle Ausbruchsisolates, inklusive des historischen Isolates aus Polen, zeigten im Mikrobouillon-Verdünnungstest eine Resistenz gegenüber Ampicillin, Mezlocillin und Cefotaxim. 95,7 % der Isolate waren resistent gegen Ceftazidim und 4,3 % (zwei Isolate) zeigten eine erhöhte MHK (4 mg/l). Gegenüber Gentamicin waren ebenfalls 95,7 % der Isolate resistent und 87 % waren unempfindlich gegenüber Chloramphenicol. Weiterhin waren 93,5 % der Isolate resistent gegenüber Sulfamethoxazol/Trimethoprim (Tabelle 3.24). Der Großteil der Isolate (87 %) war zusätzlich resistent gegenüber Oxytetracyclin.

Tabelle 3.24: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der *K. pneumoniae*-Ausbruchsisolates

Substanz	empfindlich		intermediär		resistent	
	n	%	n	%	n	%
<b>Penicilline</b>						
Ampicillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	46	100
Mezlocillin <sup>1</sup>	-	-	-	-	46	100
<b>Cephalosporine</b>						
Cefotaxim <sup>1</sup>	-	-	-	-	46	100
Cefoxitin <sup>2</sup>	9	19,6	36	78,3	1	2,2
Ceftazidim <sup>1</sup>	-	-	2	4,3	44	95,7
<b>Fluorchinolone</b>						
Ciprofloxacin <sup>1</sup>	44	95,7	1	2,2	1	2,2
Nalidixinsäure <sup>2</sup>	44	95,7	-	-	2	4,3
<b>Aminoglykoside</b>						
Amikacin <sup>1</sup>	46	100	-	-	-	-
Kanamycin <sup>2</sup>	9	19,6	34	73,9	3	6,5
Gentamicin <sup>1</sup>	2	4,3	-	-	44	95,7
<b>Phenicole</b>						
Chloramphenicol <sup>1</sup>	6	13	-	-	40	87
<b>Sulfonamide</b>						
Sulfmethoxazol/ Trimethoprim <sup>1</sup>	3	6,5	-	-	43	93,5
<b>Tetrazykline</b>						
Oxytetrazyklin <sup>3</sup>	3	6,5	3	6,5	40	87

Interpretation der MHK nach EUCAST<sup>1</sup>, CLSI<sup>2</sup> und DIN<sup>3</sup>

Weiterhin konnten in den Kerngenomdaten des Referenzstammes (234/12) die, für klinische *K. pneumoniae*-Stämme typischen, Virulenzgene *uge*, *wabG* und *ureA* identifiziert werden. Zusätzlich zu diesen konnten die Gene *mrkD*, *kfu*, *fimH* detektiert werden. Alle diese Virulenzgene waren ebenfalls im Genom des historischen ST514-*K. pneumoniae*-Isolates von 1996 (Isolat 316/12) vorhanden.

### 3.5.4 De novo-Sequenzierung des Ausbruchsstammes und Resequenzierung der ausbruchassoziierten Isolate

Zur Sequenzierung eines Referenzgenoms wurde ein Isolat ausgewählt, welches einen möglichst ursprünglichen (anzestralen) Pulsotyp zeigte und früh im Ausbruchsgeschehen



isoliert wurde. Des Weiteren sollte das Isolat die innerhalb der Ausbruchsisolate auftretenden Resistenzen gegen Gentamicin, Ampicillin, Mezlocillin, Cefotaxim, Ceftazidim sowie Chloramphenicol, Oxytetracyclin und Sulfmethoxazol/Trimethoprim zeigen. Isolat 234/12 (Tabelle 3.23) erfüllte diese Bedingungen und wurde mittels PacBio-, 454- und Illumina-Technologie *de novo*-sequenziert. Die Assemblierung der erhaltenen Sequenz-Reads resultierte in 59 Contigs chromosomaler DNA mit einer Gesamtlänge von 5 352 919 bp und 32 Contigs plasmidalen Ursprunges mit einer Gesamtlänge von 130 292 bp. Es blieb jedoch unklar, ob es sich bei den plasmidalen Contigs um mehrere oder lediglich ein Plasmid handelte, da das Plasmid-Genom in einer zu starken Fragmentierung vorlag. Der Guanine/Cytosin (GC)-Gehalt des chromosomalen Genoms betrug 58 %, der der plasmidalen Sequenzen 47 %. Mittels des RAST Annotationsserver [125] wurden auf dem chromosomalen Genom 5 068 kodierende Sequenzen, 35 rRNAs und 88 tRNAs annotiert. Auf den plasmidalen Contigs wurden 180 kodierende Sequenzen identifiziert (Tabelle 3.25).

**Tabelle 3.25: Ergebnisse der *de novo*-Sequenzierung des Isolates 234/12**

	Chromosom	Plasmid(e)
Größe	5 352 919 bp	130 292 bp
Contigs	59	32
GC-Gehalt	58 %	47 %
CDS	5 068	180
rRNA	35	-
tRNA	88	-

Mittels Illumina-Technologie wurde die bereits beschriebene Stammsammlung von 46 *K. pneumoniae*-Isolaten resequenziert. Hierbei wurden 101 bp lange *paired end* Reads erzeugt und eine durchschnittliche Coverage von mindestens 26-fach erreicht. Im Falle des Referenzgenoms (Isolat 234/12) lag die Coverage bei ca. 73-fach.

### 3.5.5 Plasmide des Referenzstammes

Die S1-Makrorestriktionsanalyse des Referenzstammes 234/12 mit anschließender PFGE zeigte das Vorhandensein eines Plasmids mit einer ungefähren Größe von ca. 360 kb. Konjugationsexperimente sowie Southern-Hybridisierung bestätigten, dass das ESBL-Gen *bla*<sub>CTX-M-15</sub> auf diesem Plasmid kodiert ist.

Aufgrund der nicht zufriedenstellenden Ausbeute an Plasmid-Genomdaten entschied man sich zu einer erneuten *de novo*-Sequenzierung von Plasmid-DNA des Referenzisolates

234/12 unter Verwendung der Illumina MiSeq Plattform am RKI Wernigerode. Mittels dieser *de novo*-Sequenzierung von Plasmid-DNA konnte mit der Software Spades [128] ein Assembly aus 2 803 Contigs (> 100 bp) mit einer Gesamtlänge von 432 923 bp generiert werden.

Auf einem 36 013 bp großem *Contig* wurden konjugative Transferproteine der Plasmid-Inkompatibilitätsklassen IncF und IncHI1 gefunden. Auf einem weiteren *Contig* von 23 145 bp konnte ein Replikase-Gen der Inkompatibilitätsgruppe IncFIB detektiert werden (Tabelle 3.26). Weiterhin konnten neun Antibiotikaresistenz-Gene auf verschiedenen Contigs gefunden werden, welche molekulare Determinanten für Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktame, Drittgenerations-Cephalosporine, Aminoglycoside, Chloramphenicol, und Tetrazykline kodieren (

Tabelle 3.27).

**Tabelle 3.26:** In den Plasmidsequenzen des Referenzisolates 234/12 gefundene Inkompatibilitätsgruppen-spezifische Gene

Plasmid- <i>Contig</i>	Start	Stop	Länge [bp]	Produkt
NODE_2660	19 461	20 588	1 127	RepFIB Replikationsprotein A
NODE_4981	16 660	17 520	860	IncF Pilus Assembly-Protein <i>TraE</i>
NODE_4981	17 522	18 691	1 169	IncHI1 Pilus Assembly-Protein <i>TrhK</i>
NODE_4981	19 256	20 536	1 280	IncF Pilus Assembly-Protein <i>TraB</i>
NODE_4981	21 867	22 604	737	IncHI1 konjugatives Transferprotein <i>TrhV</i>
NODE_4981	22 649	25 366	2 717	IncF Pilus Assembly-Protein <i>TraC</i>
NODE_2571	1 354	2 715	1 361	IncF Pilus Assembly-Protein <i>TraW</i>

**Tabelle 3.27:** Plasmidkodierte Antibiotikaresistenz-Determinanten aus dem Assembly der Plasmid-*de novo*-Sequenzierung des Referenzisolates 234/12

Plasmid- <i>Contig</i>	Start	Stop	Länge [bp]	Produkt	Gen
NODE_2550	278	937	659	Chloramphenicol-Acetyltransferase	<i>cat</i>
NODE_2653	58	918	860	Aminoglycosid-(3')-Acetyltransferase III	<i>aac(3)-III</i>
NODE_5871	50	460	410	Aminoglycosid-(3')-Phosphotransferase I	<i>aph(3')-I</i>
NODE_2613	2 793	3 596	803	Streptomycin-(3')-Kinase	<i>strA</i>
NODE_2613	3 596	4 432	836	Streptomycin-(3')-Kinase	<i>strB</i>
NODE_5741	786	1 661	875	$\beta$ -Laktamase OXA-1	<i>bla</i> <sub>OXA-1</sub>
NODE_3005	447	1 322	875	$\beta$ -Laktamase CTX-M-15	<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>
NODE_2744	1 680	2 540	860	$\beta$ -Laktamase TEM-1	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
NODE_2744	4 579	5 616	1 037	Tetrazyklin-Effluxprotein	<i>tetA</i>

### 3.5.6 Mobile genetische Elemente im Chromosom

Außer den bereits erwähnten Plasmidsequenzen konnten innerhalb des Kerngenoms 162,4 kb mobile genetische Elemente identifiziert werden, darunter vier Prophagenregionen von 18,9 kb bis 47,4 kb Größe (Tabelle 3.28). Diese Regionen kamen in allen Ausbruchsisolaten stark konserviert vor, jedoch nicht im historischen Isolat aus Polen von 1996 (316/12). Die gefundenen Prophagenregionen waren nicht in bisher verfügbaren *K. pneumoniae* Sequenzen zu finden und kodieren Proteine aus verschiedensten enterobakteriellen Phagen. Innerhalb dieser mobilen genetischen Elemente konnten keine SNPs gefunden werden.

**Tabelle 3.28: Prophagenregionen im Kerngenom des Referenzisolates (Isolat 234/12);** identifiziert mittels der Software PHAST

Prophage	Größe [bp]	CDS	Start-Contig	Base	End-Contig	Base	GC-Gehalt [%]
1	32,5	34	ctg7180000000141	82 614	ctg7180000000141	115 113	48,77
2	32,1	7	ctg7180000000229	118 132	ctg7180000000138	31 003	49,73
3	47,4	56	ctg7180000000150	34 231	ctg7180000000140	28 539	51,66
4	18,9	16	ctg7180000000131	6 880	ctg7180000000131	25 844	49,02

### 3.5.7 Nukleotidpolymorphismen innerhalb des Ausbruchs

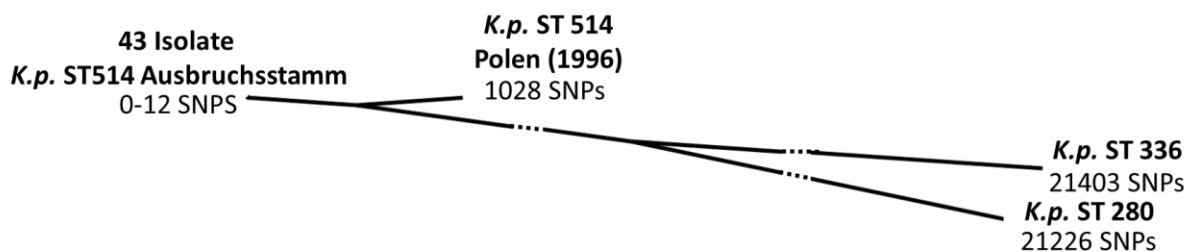
Die ausbruchsassoziierten *K. pneumoniae*-Isolate aus dem Klinikum Bremen-Mitte zeigten in 61 Positionen SNPs. Im paarweisen Vergleich waren die Genome zum Teil genetisch identisch oder wiesen eine maximale Distanz von 12 SNPs auf. Die 61 detektierten SNPs beinhalteten 27 nicht-synonyme SNPs. Von diesen Mutationen verursachten 25 eine Veränderung in der kodierten Aminosäuresequenz und zwei erzeugten ein Stopkodon. Achtzehn Mutationen waren synonym und acht lagen in nichtkodierenden Bereichen (Anhang III: Tabelle A10/11).

Auf dem bakteriellen Chromosom konnten manuell zwei Paare von SNPs detektiert werden, welche in einem Abstand von lediglich 84 und 358 Basenpaaren aufeinander folgten. Bei einer solchen Nähe von Sequenzunterschieden ist es wahrscheinlich, dass diese nicht durch zufällige Mutation, sondern durch Rekombinationsereignisse entstanden sind. Um eine Verzerrung eines phylogenetischen Signals zu vermeiden, wurden diese SNPs von den weiteren phylogenetischen Analysen ausgeschlossen. Ebenso wurde mit der Software DnaSP [117] ein homoplasischer SNP identifiziert und ausgeschlossen. Von den verbleibenden 56

SNPs waren 13 parsimonisch-informativ, d.h. sie kamen in mehr als einem Isolat vor und bestimmten somit distinkte Kladen.

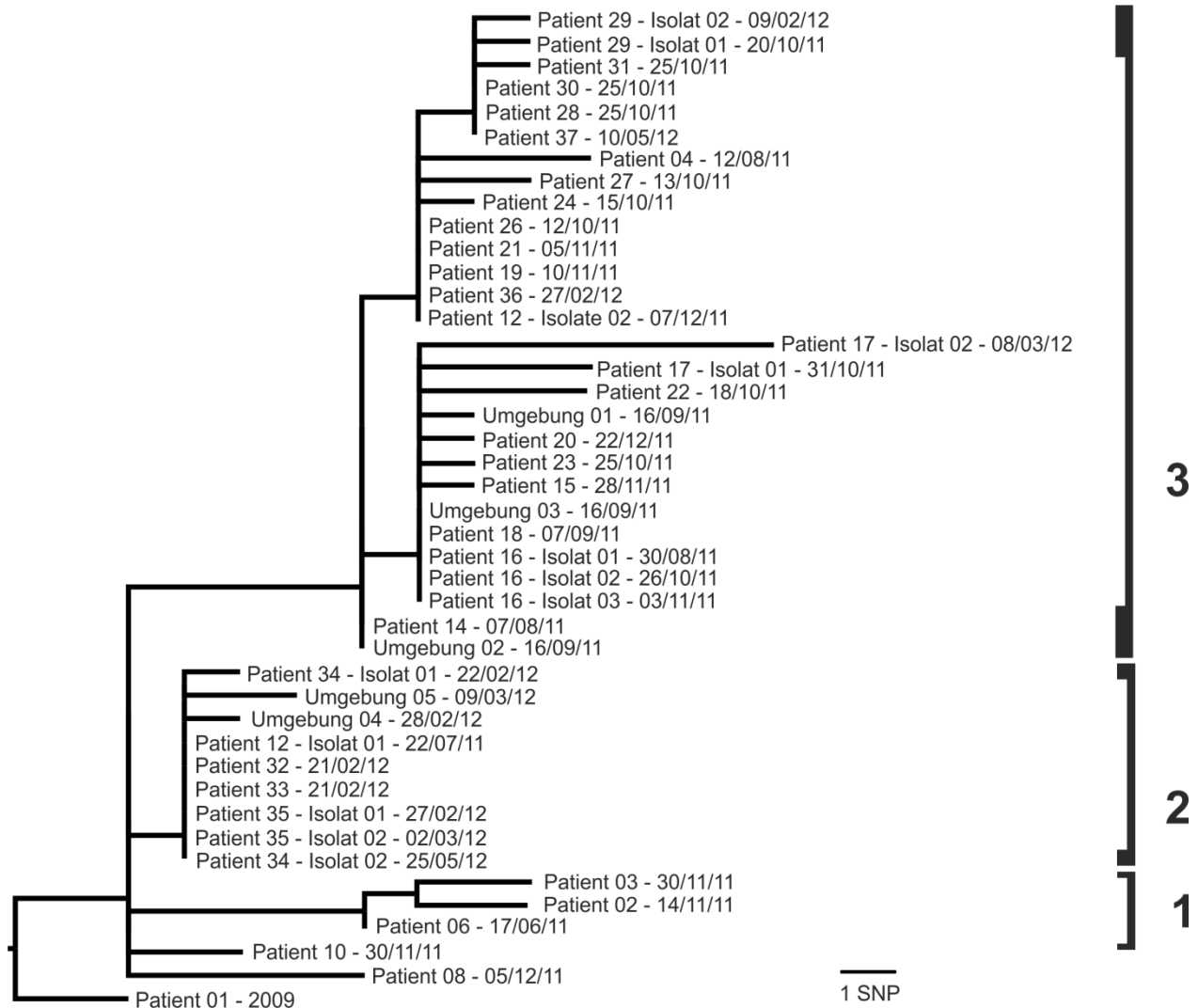
### 3.5.8 Genetische Populationsstruktur

Die Analyse der Punktmutationen im Kerngenom der sequenzierten Isolate zeigte mehr als 21 000 SNPs zwischen den Isolaten der Sequenztypen ST336/ST280 und dem ST514-Ausbruchsstamm. Die Verwendung dieser entfernten Sequenztypen als Wurzel eines phylogenetischen Maximum-Likelihood (ML)-Baumes resultierte in einer monophyletischen Klade aller ausbruchsassoziierten ST514-Isolate, in der das Isolat des polnischen ST514-*K. pneumoniae* von 1996 mit einer genetischen Distanz von 1028 SNPs am tiefsten abzweigte (Abbildung 3.9).



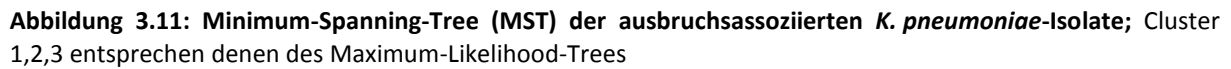
**Abbildung 3.9:** Maximum-Likelihood-Tree basierend auf dem SNP-Alignment der Kerngenome aller ausbruchsassoziierten ST514-Isolate inklusive Isolat 316/12 aus Polen 1996 und zweier Isolate entfernter Sequenztypen (255/12; 266/12)

Wird nun das historische ST514-Isolat 316/12 als Wurzel für einen ML-Baum verwendet, der nur noch alle ST514-Isolate enthält, clustern alle Bremer Ausbruchs isolate in einer Klade, in welcher das älteste Isolat des Ausbruchsgeschehens (Isolat 267/12 von 2009) am tiefsten abzweigt. Dieses wurde somit für den finalen phylogenetischen Baum des Ausbruchs als Wurzel verwendet (Abbildung 3.10).



**Abbildung 3.10: Maximum-Likelihood-Tree (MLT) aller *K. pneumoniae*-ST514-Ausbruchs-Isolate basierend auf 56 Kerngenom-SNPs mit dem ältesten Ausbruchs-Isolat (Patient 1, Isolat 267/12, 2009) als Wurzel; Die untersuchten Isolate clustern entsprechend ihrer Isolationsdaten in den Kladen 1, 2 und 3.**

In einem Minimum-Spanning-Tree für den untersuchten Datensatz (Abbildung 3.11) sind 40 von 43 Isolaten in drei Kladen lokalisiert, welche kongruent zu den Kladen des Maximum-Likelihood-Trees sind und die Isolationszeiträume widerspiegeln. Nahezu alle Verzweigungspunkte sind mit Patientenisolaten besetzt. Die ST514-Isolate aus Umgebungsuntersuchungen befinden sich zum Teil in apikalen Positionen des Baumes (Umgebung 01, Umgebung 04, Umgebung 05). In zwei Fällen (Umgebung 02, Umgebung 03) sind sie genetisch identisch zu Patientenisolaten und besetzten mit diesen gemeinsam interne Knotenpunkte.

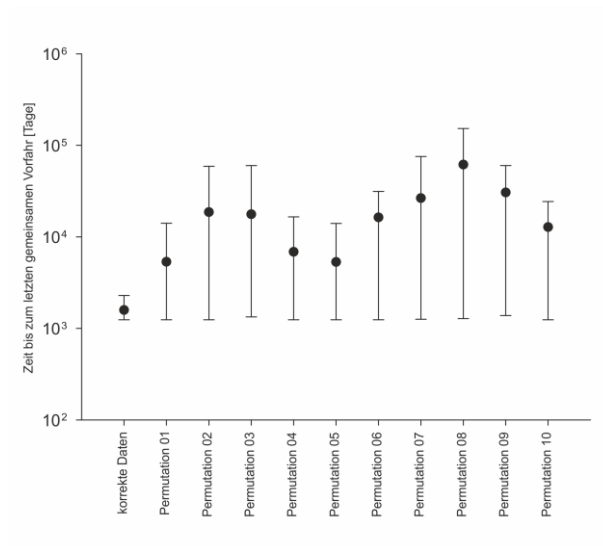


Von sechs Patienten standen mehrere, sequenziell über längere Zeiträume gewonnene, Isolate zur Analyse zur Verfügung (Abbildung 3.10). In zwei Fällen (Patient 35, 3 Tage Abstand; Patient 16, 65 Tage Abstand) zeigten die Genome der zwei bis drei sequenzierten Isolate keinerlei Sequenzunterschiede. Im Fall von Patient 34 und 29 wurden zwei Isolate im Abstand von jeweils 93 und 112 Tagen genommen. Die Genome dieser Isolate zeigen ein bis zwei SNPs Unterschied. Dies lässt darauf schließen, dass die Diversität innerhalb individueller Patienten niedrig ist und steht im Einvernehmen mit der ermittelten Substitutionsrate (siehe Abschnitt 3.5.10). Im Fall von Patient 17 in dem zwei Isolate im Abstand von 129 Tagen vorliegen, wurden neun SNPs Unterschied detektiert. Beide Isolate sind jedoch noch in derselben Klade des Maximum Likelihood-Baumes lokalisiert. Die Mehrfachisolate von Patient 12 (Isolate 233/12 und 307/12), welche im Abstand von 138 Tagen gewonnen wurden, sind sowohl im ML-Baum als auch im MST in unterschiedlichen Kladen lokalisiert und haben fünf SNPs im paarweisen Vergleich. Das zeitlich früher (2011) gewonnene Isolat

12-1 clustert gemeinsam mit den in 2012 gewonnen Isolaten in Klade 2. Das 2012 gewonnene Isolat 12-2 clustert gemeinsam mit den Isolaten aus 2011 in Klade 3 (Abbildung 3.11). Um eine Verwechslung auszuschließen wurden beide Isolate erneut vom NRZ für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum angefordert. Die Kladen-bestimmenden SNPs konnten mittels PCR bestätigt werden. Somit kann eine Verwechslung ausgeschlossen werden.

### **3.5.10 Evolutionsrate und Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr**

Auf Basis der Genomsequenzen der Ausbruchs isolate und deren zugehörigen Isolationsdaten war es mittels der Bayes'schen Analysesoftware BEAST möglich eine Evolutionsrate für den *K. pneumoniae*-Ausbruchsstamm zu berechnen. Diese beträgt  $5,5 \times 10^{-7}$  Basenaustausche pro Nukleotid pro Jahr (95 % Konfidenzintervalle,  $2,9 \times 10^{-7}$  bis  $8,4 \times 10^{-7}$ ), d.h. das Genom des Ausbruchsstamms akkumuliert etwa drei Punktmutationen pro Jahr. Ausgehend von der evolutionären Rate und der genetischen Diversität unter den Ausbruchs isolaten konnte der letzte gemeinsame Vorfahr der Ausbruchs isolate auf Anfang 2008 (95% Konfidenzintervalle; 2006 bis 2009) rückdatiert werden. Um auszuschließen, dass diese Evolutionsrate nur das Resultat der Einbeziehung des Isolates 267/12 aus dem Jahr 2009 ist, wurde dieses zum Test aus der Berechnung ausgeschlossen. Diese Berechnung ergab mit einer Evolutionsrate von  $5,4 \times 10^{-7}$  (95 % Konfidenzintervalle;  $2,8 \times 10^{-7}$  bis  $9,5 \times 10^{-7}$ ) das nahezu gleiche Ergebnis. Des Weiteren wurde zur Überprüfung der Echtheit des zeitlichen Signals eine randomisierte Permutation der Nachweisdaten vorgenommen. Hierzu wurden die Nachweisdaten zufällig auf die Genome der Ausbruchs isolate verteilt und die Berechnung mit zehn dieser permutierten Datensätzen durchgeführt. Diese Berechnungen ergaben deutlich niedrigere Evolutionsraten mit größeren Konfidenzintervallen (Abbildung 3.12), was die Authentizität des ermittelten zeitlichen Signals bestätigt.



**Abbildung 3.12:** Ergebnisse der BEAST-Berechnung der Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr (TMRCA) mit zufällig auf die Isolate verteilten Isolationsdaten



## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung ESBL-produzierender Enterobacteriaceae in Deutschland

#### 4.1.1 Limbach-Laborstudie: ESBL-Genotypen in den ESBL-*E. coli*-Isolaten aus dem Krankenhaus und dem ambulanten Bereich

Im Rahmen dieser Arbeit konnten in Zusammenarbeit mit dem Limbach-Laborverbund, insgesamt 231 ESBL-produzierende *E. coli* aus dem ambulanten Bereich (n=105) sowie Krankenhäusern (n=126) molekular charakterisiert werden.

Die molekulare Analyse der ESBL-Typen bestätigte die CTX-M-Enzyme als die vorherrschenden ESBLs in Deutschland. Insgesamt waren 96 % der ambulanten *E. coli* und 94 % der nosokomialen *E. coli* CTX-M-Bildner. Die Variante CTX-M-15 war hierbei sowohl im ambulanten (51,4 %) als auch im nosokomialen Bereich (49,2 %) am häufigsten vertreten. CTX-M-15 sowie die Typen CTX-M-1 (25,7 % ambulant, 31 % nosokomial) und CTX-M-14 (6,7 % ambulant, 4,8 % nosokomial) stellen gemeinsam > 80 % der ESBL in *E. coli*.

Die Verteilung der ESBL-Genotypen humaner *E. coli* geht einher mit Ergebnissen aus dem europäischen Umland. In einer Studie von Borlund *et al.* im Jahr 2013 wurden 913 ESBL-produzierende *E. coli*-Isolate aus Schweden molekularepidemiologisch analysiert. Dabei zeigte sich ein sehr ähnliches Bild mit CTX-M als dominanter ESBL-Familie und CTX-M-15 (> 50 %) als häufigstem ESBL-Typ. Der zweithäufigste ESBL-Typ war dort jedoch CTX-M-14 im Gegensatz zu CTX-M-1 in den deutschen Isolaten dieser Arbeit [149]. Ähnliche Erkenntnisse wurden in den letzten Jahren in Frankreich erlangt. Dort wurde in ambulanten ESBL-*E. coli* aus Harnwegsinfektionen ebenfalls CTX-M-15 (48 %) und CTX-M-1 (12,5 %) als häufigste ESBL-Typen bestätigt [150]. Weiterhin konnte von Valenza *et al.* 2013 in einer Studie an kommensalen ESBL-produzierenden *E. coli* aus gesunden Personen in der Bevölkerung in Bayern ebenfalls CTX-M-15 (43,9 %) und CTX-M-1 (24 %) am häufigsten detektiert werden [68]. Von einer ähnlichen Situation innerhalb der gesunden Bevölkerung wurde von Geser *et al.* 2011 aus der Schweiz berichtet (CTX-M-15, 41,2 %; CTX-M-1, 29,4 %) [67]. Neben Europa ist CTX-M-15 auch in Nordamerika, dem Mittleren Osten und Indien der dominierende ESBL-Typ [151].

In den schwedischen Isolaten aus Borlund *et al.* konnten 1 % SHV- und keine TEM-ESBL detektiert werden [149]. Diese wurden in dieser Arbeit in insgesamt elf Isolaten (3,5 %; 5 SHV-; 6 TEM-ESBL) identifiziert. Die niedrigen Prävalenzen von TEM- und SHV-ESBL spiegeln deren weltweit untergeordnete Rolle als Verursacher von Cephalosporin-Resistenz in humanen Enterobacteriaceae wieder [69, 90]. Seit Anfang der 2000er wird bereits von einem drastischen Umschwung in der weltweiten ESBL-Population vom vorherrschenden Vorkommen der SHV- und TEM-ESBLs hin zu einer Prädominanz der CTX-M-Enzyme berichtet [63, 151].

Erwähnenswert ist das Auftreten des weltweit seltenen ESBL-Typen CTX-M-104 (CTX-M-Gruppe 9) in einem Isolat einer ambulanten Harnwegsinfektion einer 65 jährigen Patientin aus Rheinlad-Pfalz. CTX-M-104 unterscheidet sich in zwei Aminosäure-Substitutionen (A234V; S275N) von CTX-M-9 und wurde bis dato lediglich in einem Huhn 2012 und zwei Isolaten aus Schweinekot 2013 in China detektiert [152-154].

Die Analyse der phylogenetischen Gruppen der untersuchten *E. coli*-Isolate zeigte, sowohl im ambulanten als auch im nosokomialen Bereich, ein prädominantes Vorkommen von Isolaten der Gruppe B2 (42,9 % nosokomial; 48,6 % ambulant) (Abbildung 4.1). Dies geht einher mit der Tatsache, dass die als virulenter geltenden extra-intestinalen Linien von *E. coli* zum größten Teil Gruppe B2 zuzuordnen sind. Kommensale Stämme hingegen gehören eher der Gruppe A an [107, 155].

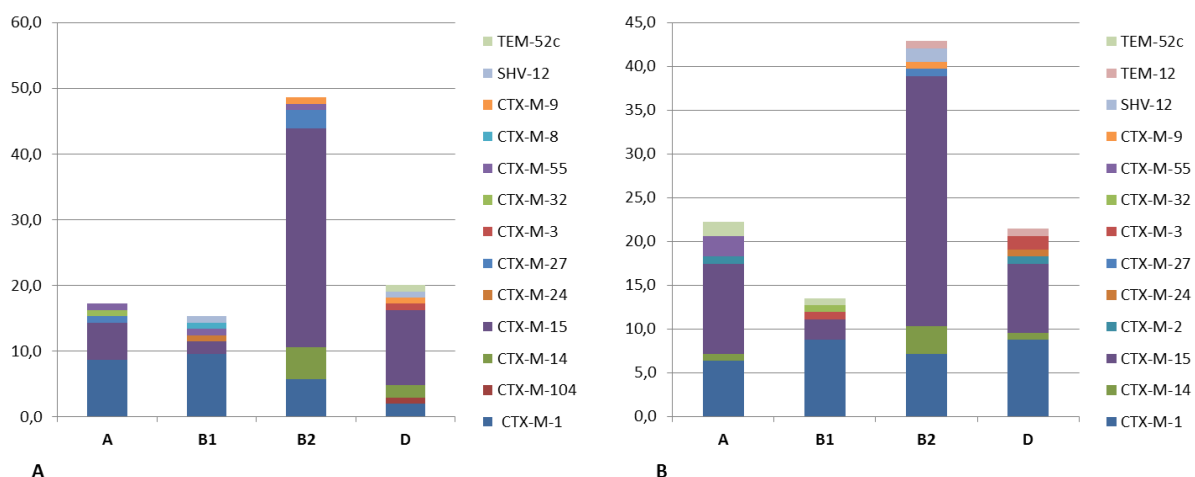
Nahezu alle *E. coli*-Stämme des Sequenztypes 131 mit dem Serotyp O25b:H4 und CTX-M-Bildung sind der Phylogruppe B2 zuzuordnen. Dieser Sequenztyp ist weltweit beschrieben und stellt in einigen Ländern 20-40% der ESBL-bildenden *E. coli* im ambulanten Bereich und auch im Krankenhaus [156, 157]. Frühere Studien in deutschen Pflegeheimen und Krankenhäusern zeigten, dass ST131 *E. coli* auch in Deutschland weit verbreitet sind [158, 159]. Daher ist anzunehmen, dass der hohe Anteil von B2-*E. coli* in der vorliegenden Arbeit zum Teil im Vorkommen von *E. coli* ST131 begründet ist. Eine MLST-Typisierung zur Ermittlung des *E. coli* Sequenztypes wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Neben den B2-*E. coli* fiel in dieser Studie das erhöhte Vorkommen (22 %) von Gruppe A-*E. coli* im nosokomialen Bereich auf. Rüden *et al.* beschrieb 1997, dass es sich bei den von nosokomialen Infektionen betroffenen Patienten in Krankenhäusern mehrheitlich um Menschen höheren Alters handelt. Dies wird in der vorliegenden Studie durch das höhere

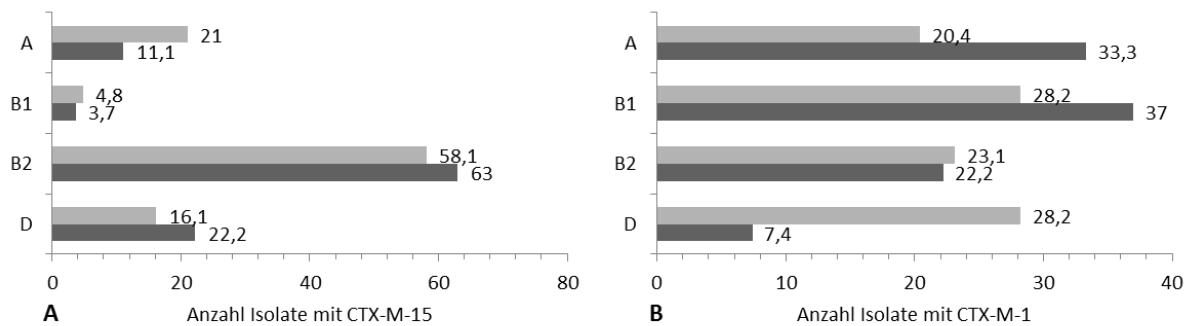
Durchschnittsalter von 67,2 Jahren (vgl. 59,8 Jahre im ambulanten Bereich), sowie die Verteilung auf die verschiedenen Altersgruppen belegt (Tabelle 3.6) [160]. Zudem weisen hospitalisierte Patienten häufig ein durch Vorerkrankungen geschwächtes Immunsystem auf. Im Zuge derartiger Schwächungen können auch Infektionen mit den weniger virulenten Stämmen der Gruppe A auftreten.

Betrachtet man die Verteilung der zwei häufigsten ESBL-Typen CTX-M-15 und CTX-M-1 auf die phylogenetischen Gruppen von *E. coli* (Abbildung 4.2), zeigt sich bei den ambulanten und nosokomialen CTX-M-15-produzierenden Isolaten ein ähnliches Bild wie in der Gesamtverteilung in Abbildung 4.1. Dieser hohe Anteil an B2-*E. coli* ist vermutlich auf die weltweite Verbreitung des *E. coli*-Sequenztypes ST131 zurückzuführen, welcher bekanntlich besonders häufig mit CTX-M-15 assoziiert ist [81, 161, 162].

Im Falle der CTX-M-1-produzierenden *E. coli* hingegen wird deutlich, dass vor allem im ambulanten Bereich ein hoher Anteil der Gruppen B1 (37 %) und A (33,3 %) vertreten ist (Abbildung 4.2 B). In den Bevölkerungsisolaten der Studie von Valenza *et al.* zeigte sich ebenfalls ein hohes Vorkommen (40,3 %) der Phylogruppe A [68]. Dies lässt sich damit erklären, dass die in dieser Studie analysierten *E. coli*-Isolate von gesunden Personen stammen und es sich dabei wahrscheinlich um kommensale Stämme handelt.



**Abbildung 4.1: Verteilung der in den *E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund detektierten ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen; A) ambulante Isolate (n=105); B) nosokomiale Isolate (n=126)**



**Abbildung 4.2: Phylogenetische Gruppen der *E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund mit den zwei häufigsten ESBL CTX-M15 und CTX-M-1; A) ambulante (dunkelgrau, n=55) und nosokomiale (hellgrau, n=27) CTX-M-15-produzierende *E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund; B) ambulante (dunkelgrau, n=62) und nosokomiale (hellgrau, n=39) CTX-M-1-produzierende *E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund**

Die Bestimmung der antimikrobiellen Resistenzen zeigt im nosokomialen und ambulanten Bereich der Labor-Limbach-Isolate sehr ähnliche Ergebnisse. Alle Isolate zeigten eine hundertprozentige Resistenz gegenüber den getesteten Penicillinen sowie den Drittgenerations-Cephalosporinen Cefotaxim und/oder Ceftazidim. Im ambulanten (75,2 %) sowie im nosokomialen (70,6 %) Bereich sind hohe Resistenzraten gegenüber Ciprofloxacin, zusätzlich zur  $\beta$ -Laktam-Resistenz, zu verzeichnen. Dies wird durch das bereits beschriebene Co-Resistenzphänomen von CTX-M-bildenden Enterobacteriaceae erklärt. Gerade PMQR, wie *qnr*-Gene, sind häufig innerhalb derselben mobilen genetischen Elemente lokalisiert wie *bla*<sub>CTX-M</sub>-Gene [71, 163]. Diese Isolate werden als 3-MRGN klassifiziert, wodurch die KRINKO-Hygienerichtlinien, wie z.B. eine Isolierung des Patienten in sog. Risikobereichen (z.B. Intensivstationen), zum tragen kommen [82]. Keines der untersuchten Isolate zeigte jedoch eine Resistenz gegenüber Carbapenemen.

In 40,1 % der ambulanten und 36,3 % der nosokomialen *E. coli* konnten die PMQR-Gene *aac*(6')*1b-cr*, *qnrA*, *qnrB* oder *qnrS* nachgewiesen werden. Vier Isolate mit *aac*(6')*1b-cr* zeigten jedoch keine Ciprofloxacin-Resistenz und ein Isolat mit *qnrS* zeigte lediglich eine erhöhte MHK (1mg/l). Weitere, die Resistenz gegenüber Fluorchinolonen beeinflussende, Faktoren sind Mutationen in den Untereinheiten A und B der DNA-Gyrase (*gyrA*, *gyrB*) oder der Topoisomerase IV (*parE*, *parC*) sowie Efflux-Systeme. Diese wurden in dieser Arbeit jedoch nicht getestet. Erst die Kombination von PMQR mit Efflux-Systemen und/oder Gyrase/Topoisomerase-Mutationen führt zu einer Resistenz gegenüber Fluorchinolonen

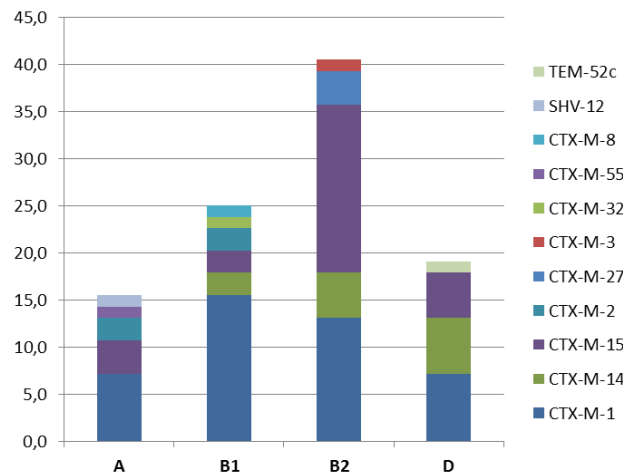
[164]. Daher ist anzunehmen, dass weitere Resistenzdeterminanten in den nicht resistenten Isolaten fehlen.

Ein limitierender Faktor dieser Studie sind fehlende klinische Daten zu den Patienten, welche aus Datenschutzgründen von den Krankenhäusern nicht oder nur unvollständig an die diagnostischen Labore weitergegeben wurden. Im Fall der ambulanten ESBL-*E. coli* lagen für 11 Patienten Informationen über eine Vorerkrankung vor, für die übrigen Patienten waren keine weiteren Informationen verfügbar. Daher können Risikofaktoren für eine Besiedlung mit ESBL-produzierenden Erregern, wie eine frühere Hospitalisierung, nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Dies könnte zur Folge haben, dass in den ambulanten Isolaten aus dem Limbach-Laborverbund auch ESBLs detektiert wurden, welche nosokomialer Herkunft sind. Die Verteilung der ESBL-Genotypen entspricht jedoch trotzdem der in ambulanten *E. coli* beschriebenen [67, 68, 150].

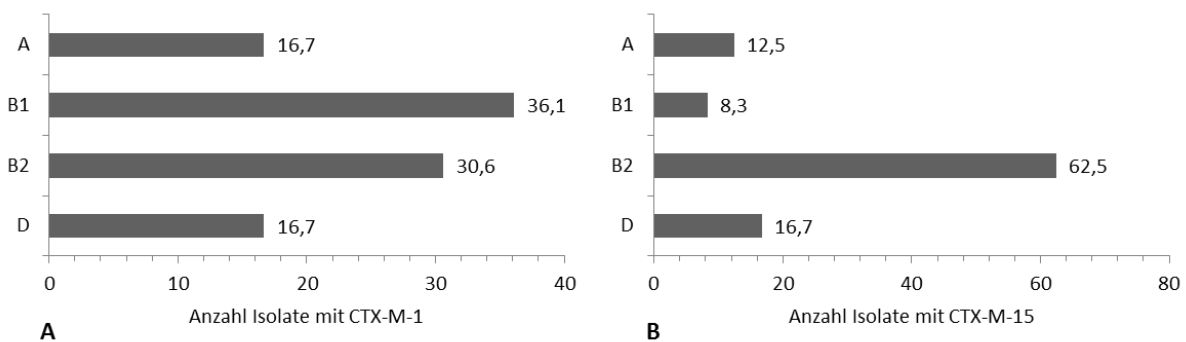
#### **4.1.2 Fall-Kontrollstudie der Charité Berlin**

Die Diversität der ESBL-Typen in der Fall-Kontroll-Studie der Charité Berlin war ähnlich derer der Limbach-Labor-Studie, jedoch war hier CTX-M-1 mit 42,9 % der häufigste ESBL-Typ gefolgt von CTX-M-15 mit 28,6 %. Ebenfalls wies die Verteilung der phylogenetischen Gruppen Unterschiede auf (Abbildung 4.3). Zwar wurden auch hier in erster Linie Isolate der Gruppe B2 (40,5 %) identifiziert, jedoch hatte Gruppe B1, mit 25 % aller Isolate, einen deutlich höheren Anteil als in den Isolaten aus dem Limbach-Laborverbund. Betrachtet man die Phylogruppen der *E. coli* mit den zwei häufigsten ESBL-Typen CTX-M-1 und CTX-M-15 zeigt sich, dass die Gruppenverteilung der CTX-M-15-produzierenden Isolate ähnlich der Limbach-Isolate ist. Innerhalb der CTX-M-1-produzierenden *E. coli* sind Gruppe B1 und B2 am häufigsten (Abbildung 4.4).

Die Studien von Valenza *et al.* 2013 und Geser *et al.* 2011 bestätigen jedoch eine Dominanz von CTX-M-15 in *E. coli* aus der Bevölkerung in Deutschland und der Schweiz [67, 68]. CTX-M1 war in diesen Studien die jeweils zweithäufigste Variante mit einem Anteil von 24,2 %-29,4 %. Die überproportionale Häufigkeit von CTX-M-1 in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie der Charité könnte durch regionale Besonderheiten zu erklären sein. Die beprobten Patienten dieser Studie kamen nahezu alle aus dem Raum Berlin. Demnach würde die Verteilung von ESBL-Genotypen und phylogenetischen Gruppen eher eine lokale Situation widerspiegeln.



**Abbildung 4.3:** Verteilung der in den ambulanten *E. coli* aus der Charité Berlin detektierten ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen



**Abbildung 4.4:** Phylogenetische Gruppen der ambulanten *E. coli* aus der Charité Berlin mit den zwei häufigsten ESBL CTX-M1 und CTX-M-15; A) ambulante CTX-M-1-produzierende *E. coli*, n= 36; B) ambulante CTX-M-15-produzierende *E. coli*, n=24

#### 4.1.3 Untersuchungen von $\beta$ -Laktamasen in Cephalosporin-resistenten *Salmonella enterica* in Deutschland 2005-2011

Die Analysen der ESBL- und AmpC-produzierenden *Salmonella enterica* aus dem Nationalen Referenzzentrum (NRZ) für Salmonellen und andere Enteritiserreger in Wernigerode zeigten, dass das Serovar *Salmonella* Typhimurium mit 48,7 % das häufigste im betrachteten Zeitraum war. Bei *S. Typhimurium* handelt es sich, mit 19 250 Fällen im Jahr 2011, um das in Europa zweithäufigste Serovar hinter *S. Enteritidis* mit 34 385 Fällen [165]. *S. Enteritidis* war in der vorliegenden Studie jedoch mit 4,1 % nur zu geringem Anteil vertreten.

Bei näheren Untersuchungen der Isolate des Serovars *S. Typhimurium* im NRZ wurden 23 Isolate (31,5 %) als die monophasische Variante 4,[5],12:i:- identifiziert. Monophasische, ESBL-produzierende *Salmonella* Typhimurium wurden kürzlich ebenfalls bei Schweinen, Schafen, Rindern und Geflügel gefunden [166]. Acht der neun dort untersuchten Stämme produzierten die ESBL CTX-M-1. In vier dieser Isolate war CTX-M-1 auf einem ca. 100 kb großen IncI-Plasmid kodiert. Der hohe Prozentsatz an monophasischen ESBL-produzierenden *Salmonella* Typhimurium in dieser Arbeit ist der generell steigenden Anzahl von monophasischen *Salmonella* Typhimurium in Deutschland (NRZ Datenbank n=82 in 2005 bis n=621 in 2011) und Europa zuzuschreiben [165, 167]. In der Mehrheit (60,1 %), der in dieser Arbeit untersuchten *S. enterica*-Stämme, wurde der ESBL-Typ CTX-M-1 gefunden. Von ähnlichen Resultaten wurde in *S. enterica*- und *E. coli*-Isolaten aus Nutztieren (speziell aus Hühnern und Hähnchenfleisch) berichtet [89, 166]. Zusätzlich zeigte die detaillierte molekulare Analyse teilweise die gleichen ESBL- und AmpC-Typen (z.B. CTX-M-1, TEM-52 und CMY-2), die bereits in anderen Studien an Nutztieren in Deutschland beschrieben wurden [166].

Bemerkenswerterweise wurde der in humanen *E. coli*-Isolaten am häufigsten detektierte ESBL-Typ CTX-M-15 [65, 90] lediglich in sechs humanen *S. enterica*-Isolaten, inklusive eines *S. Typhi*-Isolates aus dem Ausland [109], gefunden. Der Vergleich der Resultate dieser Studie mit Daten aus internationalen Studien bestätigt, dass der ESBL-Typ CTX-M-1 und der AmpC-Typ CMY-2 die weltweit am meisten detektierten  $\beta$ -Laktamasen in Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten Salmonellen sind [168].

In Spanien konnte vor kurzem ein *Salmonella*-Stamm beschrieben werden, welcher das *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-Gen auf einem 100 kb großem IncI1/N Plasmid trägt und eine mögliche transnationale Transmission eines resistenten *Salmonella*-Klons bzw. Plasmids verdeutlicht [169]. In der vorliegenden Arbeit kann eine solche Transmission eines CTX-M-1-produzierenden *Salmonella* Typhimurium DT193-Stammes von Schweinen auf den Menschen postuliert werden. Weiterhin gibt es Anzeichen für die Transmission eines *Salmonella* Paratyphi B(dT+)-Stammes mit CTX-M-1 und/oder TEM-52 von Hühnern auf den Menschen.

Der plasmidvermittelte Transfer von Resistenzgenen trägt entscheidend zur weiteren Verbreitung von ESBL- und AmpC- $\beta$ -Laktamasen in Salmonellen bei. Daher ist es zielführend weiterhin Drittgenerations-Cephalosporin-resistente *S. enterica*-Stämme molekular zu

charakterisieren und humane Stämme mit denen aus Tier- und Lebensmittelisolaten zu vergleichen. Nur auf diese Weise können eventuelle Transmissionsketten entdeckt und aufgeklärt werden.

#### 4.1.4 Untersuchungen zum seltenen ESBL-Typ CTX-M-8 in Deutschland

Seit der ersten Beschreibung von CTX-M-8 in Brasilien im Jahr 2000 wurde diese  $\beta$ -Laktamase in verschiedensten Enterobacteriaceae, wie *K. pneumoniae*, *Citrobacter amalonaticus* und *E. coli* detektiert [170, 171]. In dieser Arbeit konnte CTX-M-8 erstmals in *Salmonella enterica* nachgewiesen werden [93]. Informationen über *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragende Plasmide sind nur spärlich vorhanden. Ein 75 kb großes *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragendes Plasmid wurde in Brasilien beschrieben und ein Inc11/IncL/M Plasmid konnte in Uruguay identifiziert werden [170, 171].

Bemerkenswerterweise konnten verschiedenste CTX-M-8-produzierende Enterobacteriaceae-Spezies in verschiedenen Studien aus ambulanten und nosokomialen Patienten sowie aus der Nahrungsmittelkette isoliert werden [170-173]. In dieser Arbeit wurden CTX-M-8-produzierende Pathogene im menschlichen Darm, als Salmonellose-Erreger, als Erreger von Harnwegsinfektionen aber auch in einer Probe aus Rinderhackfleisch identifiziert. In Anbetracht der Ähnlichkeit der *bla*<sub>CTX-M-8</sub>-tragenden Plasmide und dem starken Einfluss von horizontalem Gentransfer, auch zwischen verschiedenen enterobakteriellen Spezies, können verschiedene Hypothesen zur Verbreitung der CTX-M-8 produzierenden Erreger aufgestellt werden. Einerseits wäre es möglich, dass CTX-M-8-produzierende Enterobacteriaceae durch kontaminierte Nahrungsmittel auf den Menschen übertragen wurden und innerhalb der Bevölkerung durch konjugativen Plasmidtransfer zwischen verschiedenen enterobakteriellen Spezies weiterübertragen werden. Diese Hypothese würde durch die Identifikation von CTX-M-8 in *Salmonella enterica* in Rinderhackfleisch im Rahmen dieser Arbeit gestützt. Andererseits wäre auch ein Eintrag CTX-M-8-produzierender Erreger durch Reisende aus dem Ausland denkbar, wie er bereits in Spanien und den USA beschrieben wurde [174, 175]. Jedoch kann aufgrund fehlender epidemiologischer Daten zu den in dieser Arbeit untersuchten Isolaten keine dieser Hypothesen bewiesen werden.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass CTX-M-8 in Deutschland zwar noch selten ist, aber in verschiedenen enterobakteriellen Spezies (*E. aerogenes*, *S. enterica*, *E. coli*) auf ähnlichen konjugativen Plasmiden detektiert werden konnte. Im Falle der im Bereich der humanen



*E. coli* extrem häufig vorkommenden ESBL-Typen CTX-M-15 und CTX-M-1 ist eine Auflösung von Transmissionswegen aufgrund der sehr weiten Verbreitung dieser Genotypen schwer möglich. Seltene ESBL-Typen, wie CTX-M-8, welche auf sehr nah verwandten Plasmiden kodiert sind, könnten hier bei einer gezielten Suche nach CTX-M-8-Isolaten und der Erhebung epidemiologischer Daten Auskunft über die Verbreitungswege der Resistenzgene in *Enterobacteriaceae* geben. In Anbetracht eines einheitlichen konjugativen Plasmids und der Seltenheit dieses ESBL-Typs könnten sich an einem solchen Beispiel Transmissionsketten einfacher aufzeigen lassen, da hier ein deutlich geringeres „Hintergrundrauschen“ besteht als bei den häufigen ESBL-Typen.

#### 4.1.5 ESBL und die Frage nach dem zoonotischen Reservoir

In den bisher diskutierten Abschnitten dieser Arbeit wurden 473 Enterobacteriaceae-Isolate (*E. coli*, n=319; *Salmonella enterica*, n=150; Andere n=4) mit Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz molekular charakterisiert. In allen Studien konnten das dominante Vorkommen der CTX-M-ESBL [63, 65, 69] bestätigt werden. Der weltweit im humanmedizinischen Bereich vorherrschende ESBL-Typ CTX-M-15 [69] konnte in *E. coli* aus dem ambulanten und nosokomialen Bereich als Hauptverursacher für eine Drittgenerations-Cephalosporin-Resistenz identifiziert werden. Neben CTX-M-15 ist CTX-M-1 der zweithäufigste in Deutschland detektierte ESBL-Typ. In der gesunden Allgemeinbevölkerung wurde eine Kolonisationsrate mit ESBL-bildenden *E. coli* von 6,3 % in Deutschland und 5,8 % im Nachbarland Schweiz bestimmt. Auch in diesen Studien ist CTX-M-15 der meistdetektierte ESBL-Typ in *E. coli* [67, 68]. Der global erfolgreiche *E. coli* ST131 O25b:H4 wurde in den Schweizer Isolaten nicht gefunden und auch in Valenza *et al.* wurde die phylogenetische Gruppe B2, zu welcher der größte Teil dieser virulenten Stämme zuzuordnen ist, nur wenig gefunden. CTX-M-15 befindet sich demnach im Bereich ambulanter und nosokomialer Infektionen in einem anderen Stammhintergrund als in der gesunden Bevölkerung. Dies spricht für eine Übertragung von *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-kodierenden Plasmiden zwischen kommensalen und virulenten *E. coli*-Stämmen verschiedener phylogenetischer Linien. Die Richtung dieses Transfers ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt nicht feststellbar.

Längst ist eine verbreitete Kolonisation von Nutztieren mit Drittgenerations-Cephalosporin-resistenten *E. coli*, aber auch anderen Enterobacteriaceae, bekannt. Neueste Studien, vorrangig durchgeführt an Geflügel, Rindern und Schweinen bestätigen die Verbreitung von ESBLs als Ursache für diese Resistenz [176-178]. Speziell in Hühnerfarmen waren die Tiere

meist von der Einstallung an mit ESBL- oder AmpC-bildenden *E. coli* kolonisiert [177, 179]. In diesen Nutztierarten ist CTX-M-1 der vorherrschende ESBL-Typ (28 % in Hühnern; 72 % in Schweinen und Kühen). Der im humanen Bereich weltweit dominante ESBL-Typ CTX-M-15 ist in tierischen Isolaten nur sporadisch (< 8 %) vorhanden [86]. Ein tierisches Reservoir von CTX-M-15 ist damit sehr unwahrscheinlich.

Auch in der Nahrungsmittelkette gewinnen ESBL- und AmpC-bildende Enterobakterien zunehmend an Bedeutung [87, 89, 180, 181]. So konnten in Schweden ESBL-*E. coli* auf Hähnchen- und Rind- und Schweinefleisch festgestellt werden, welches aus verschiedenen EU-Ländern nach Schweden importiert wurde [180]. In allen drei Fleischsorten war CTX-M-1 der vorherrschende ESBL-Typ. Diese Erkenntnis wird von anderen europäischen Studien an Nutztieren bzw. Tierprodukten bestätigt [86-88, 179, 182]. Ebenso war der ESBL-Typ CTX-M-1 in allen Isolaten dieser Studie, sowohl in *E. coli* (Limbach ambulant 25,7 %; Limbach nosokomial 31 %; Charité ambulant 42,9 %) als auch in *S. enterica* (60,7 %) hochprävalent. Aufgrund der dargelegten Fakten kann also im Falle von CTX-M-1 ein Reservoir innerhalb der Nutztierhaltung vermutet werden.

Auch Haustiere sind von einer Kolonisation mit ESBL-bildenden Erregern betroffen [86, 183-185]. So stellten Ewers *et al.* den eigentlich für den Menschen typischen *E. coli* O25:H4-ST131 bei Haustieren fest [185]. Dies lässt darauf schließen, dass in diesem Falle ein Transfer eines human-assoziierten Stammes auf Tiere stattgefunden hat. Diese Annahme wird durch die Beschreibung Carbapenemase (OXA-48)- und CTX-M-15-bildender *K. pneumoniae* weiter gestützt, welche 2012 aus Hunden isoliert wurden [186]. Des Weiteren konnten Mather *et al.* durch Genomanalysen an *S. Typhimurium* DT104 zeigen, dass eine Übertragung dieser Erreger vom Menschen auf Tiere wahrscheinlicher ist, als in der entgegengesetzten Richtung [187].

Es bleibt die Frage, ob die Verbreitung von ESBLs lediglich durch die Transmission ESBL-produzierender Bakterienstämme verursacht wird. Deutlich wahrscheinlicher ist es, dass die Verbreitung von ESBLs von einer Kombination aus der Übertragung von Bakterienstämmen sowie dem horizontalen inter- und intraspezifischen Transfer von Resistenz-Plasmiden getragen wird.

CTX-M-1-produzierende *E. coli* konnten mehrfach in Mensch, Tier und Fleischprodukten [86-89, 179-182] nachgewiesen werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit eine putative

---

Übertragung sowohl CTX-M-1-bildender *S. enterica* Typhimurium von Schweinen auf den Menschen, als auch TEM-52–produzierender *S. enterica* Paratyphi von Hühnern auf den Menschen gezeigt. Eine Übertragung von ESBL-produzierenden Bakterienstämmen vom Tier auf den Mensch über die Nahrungsmittelkette scheint daher sehr wahrscheinlich. Ebenso existieren aber auch Anzeichen für eine Übertragung CTX-M-15-produzierender *E. coli* vom Menschen auf Haustiere [183-185]. Weiterhin spricht die Lokalisation von CTX-M-8 auf nahverwandten IncI1-Plasmiden in *E. coli*, *E. aerogenes* und *S. enterica* für die Übertragung *bla*<sub>ESBL</sub>-kodierender Plasmide zwischen verschiedenen Spezies von Enterobacteriaceae.

Die zunehmende Verbreitung von ESBL-bildenden Enterobacteriaceae im Gesundheitssektor, der Nutztierhaltung, der Nahrungsmittelkette und auch in der gesunden Bevölkerung ist ein wachsendes Problem für die öffentliche Gesundheit in Deutschland. Betrachtet man die Kolonisationsrate von 6,3 % für ESBL-bildende *E. coli* [68] in der Bevölkerung, sowie das Vorkommen gleicher ESBL-Typen im ambulanten und nosokomialen Bereich zeigt sich eine weitere Gefahr: ESBL-bildende Erreger können jederzeit aus der Bevölkerung in Krankenhäuser eingetragen werden. Betrachtet man dies im Kontext mit einer möglichen Tier-Mensch Übertragung zeichnet sich eine besorgniserregende Vernetzung ab, deren Eindämmung Infektiologen, Mikrobiologen, Krankenhaushygieniker, Lebensmittel-mikrobiologen und Veterinärmediziner vor neue Herausforderungen stellt.

## 4.2 Untersuchung eines Ausbruchs ESBL-produzierender *K. pneumoniae* auf einer neonatologischen Intensivstation

Risikopatienten in Krankenhäusern sind häufig von Infektionen mit ESBL-bildenden Enterobacteriaceae betroffen. Neben *E. coli* ist vor allem *K. pneumoniae* ein prominenter Verursacher nosokomialer Infektionen und Ausbrüche [108, 188-191] und besonders neonatologische Intensivstationen sind häufig von Ausbrüchen mit diesem Erreger betroffen [190, 192-194]. In dieser Arbeit wurde ein Ausbruch ESBL-produzierender *K. pneumoniae* des Sequenztyps ST514 auf einer neonatalen Intensivstation mittels Ganzgenom-Sequenzierung und phylogenetischer Berechnungen auf Basis von Maximum-Likelihood- und Bayes'schen Analysen untersucht. Im Rahmen dieser Aufarbeitung eines Ausbruches ESBL-produzierender *K. pneumoniae* konnten wertvolle Erkenntnisse über den Verlauf des Ausbruchsgeschehens gewonnen werden, welche durch klassische epidemiologische Untersuchungen allein verborgen geblieben wären.

### 4.2.1 Charakterisierung des Ausbruchsstammes

Unter der Verwendung verschiedener Sequenzierungstechnologien konnte das 5,3 Mb große Chromosom des *K. pneumoniae*-ST514-Ausbruchsstammes sequenziert werden. Des Weiteren konnte die DNA-Sequenz für 423 kb plasmidischer DNA ermittelt werden. Die aus dieser Sequenzierung resultierenden chromosomalen Contigs zeigten einen hohen Grad an Ähnlichkeit in der Anordnung der kodierenden Sequenzen (Syntenie) verglichen mit anderen, bereits publizierten *K. pneumoniae*-Genomen [144, 195, 196]. Der Sequenztyp ST514 des Ausbruchsstammes sowie die zuvor vom NRZ für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum detektierten Resistenzgene *bla*<sub>SHV-63</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> und *bla*<sub>CTX-M-15</sub> konnten mittels der Genomdaten bestätigt werden. Zusätzlich konnten plasmidvermittelte Resistenzdeterminanten für nahezu alle, mittels MHK-Testung ermittelten, Antibiotikaresistenzen auf den Plasmid-Contigs identifiziert werden (Tabelle 3.27). Lediglich für die Resistenz gegenüber Sulfonamiden wurde keine genetische Determinante identifiziert.

Eine mögliche Erklärung dafür sind die in dieser Arbeit aufgetretenen Probleme bei der Sequenzierung der Plasmide des *K. pneumoniae*-Ausbruchsstammes. Insgesamt konnten 420 kb plasmidaler DNA sequenziert werden. Jedoch war diese mit einer Anzahl von 2 803 Contigs (> 100 bp) so stark fragmentiert, dass eine Zuordnung der Contigs zu einem oder

möglicherweise mehreren Plasmiden nicht möglich war. Die Gründe für diese Fragmentierung sind bisher ungeklärt geblieben. Dennoch konnten auf diesen plasmidalen Contigs Gene der Inkompatibilitätsgruppen IncF, IncHI1 und IncFIB detektiert werden (Tabelle 3.26). Ob es sich dabei um ein Multireplikon-Plasmid, oder aber mehrere Plasmide verschiedener Inkompatibilitätsgruppen handelt, kann durch die vorliegenden Daten nicht sicher geklärt werden. IncF-Plasmide sind meist > 100 kb groß und bekannt für die hohe Zahl mit ihnen assoziierter Resistenzgene. Weiterhin kodieren sie häufig für mehrere Replicons, wie IncFIB, FII und FIA [73, 197]. Das bekannteste IncF-Plasmid, welches das *bla*<sub>CTX-15</sub>-Gen kodiert, wurde im pandemischen, multi-resistenten, virulenten *E. coli* O25:H4-ST131 beschrieben [198]. Es ist also wahrscheinlich, dass es sich bei den generierten Plasmiddaten um ein Multireplikon-Plasmid und eventuell ein weiteres IncHI1-Plasmid handelt.

#### **4.2.2 Genetische Verwandtschaft der *K. pneumoniae* Ausbruchs isolate und Bestätigung des Ausbruches**

Die Genomsequenzen der *K. pneumoniae*-ST514-Ausbruchs isolate auf der betroffenen neonatologischen Station im Klinikum Bremen-Mitte weisen im paarweisen Vergleich nur sehr wenige Sequenzunterschiede auf (maximal 12 SNPs). Dies verdeutlicht ihre extrem nahe genetische Verwandtschaft und bestätigt einen epidemiologischen Zusammenhang. Dies wird weiterhin gestützt, da es sich beim Ausbruchsstamm um einen sehr seltenen Sequenztyp handelt, welcher noch nie innerhalb Deutschlands beschrieben wurde. Das erste und einzige Mal wurde das Auftreten des *K. pneumoniae*-Sequenztyps ST514 im Jahr 1996 im Rahmen eines Ausbruches ESBL-bildender *K. pneumoniae* im polnischen Wroclaw dokumentiert, welcher sich ebenfalls auf einer neonatologischen Station ereignete. Zum einzigen verfügbaren Isolat dieses Ausbruches weist der Bremer Ausbruchsstamm mehr als 1000 SNPs und damit nur eine entfernte genetische Verwandtschaft auf. All dies bekräftigt die Annahme, dass es sich bei den Transmissionseignissen auf der neonatologischen Station in Bremen um einen tatsächlichen Ausbruch eines *K. pneumoniae*-ST514-Klones handelt und nicht um ein, durch wiederholten Eintrag verursachtes, gehäuftes Auftreten.

#### **4.2.3 Evolutionsrate des Ausbruchsstammes und Datierung des Ausbruchs**

Basierend auf der Sequenzvariabilität der Ausbruchs isolate und deren Isolationsdaten konnte mittels Bayes'scher Analysen berechnet werden, dass der *K. pneumoniae*-Ausbruchsstamm  $5,5 \times 10^{-7}$  Basenaustausche pro Nukleotid und Jahr akkumuliert, was etwa 3

Mutationen im Kerngenom pro Jahr entspricht. Diese Evolutionsrate ist ähnlich derer von *Clostridium difficile* ( $3 \times 10^{-7}$ ) [199], *Mycobacterium tuberculosis* ( $2 \times 10^{-7}$ ) [200] und *Vibrio cholerae* ( $8.3 \times 10^{-7}$ ) [201], jedoch niedriger als die für *Staphylococcus aureus* ( $2 \times 10^{-6}$ ) [202, 203] ermittelte Substitutionsrate. Eine Evolutionsrate für *K. pneumoniae* war zum Zeitpunkt dieser Arbeit noch nicht publiziert.

Basierend auf dieser Evolutionsrate war es möglich die Zeit bis zum Auftreten des letzten gemeinsamen Vorfahr (TMRCA) der Ausbruchs isolate zu berechnen. Dieser Vorfahr trat laut der Berechnungen etwa Anfang 2008 auf, was darauf hinweist, dass der Ausbruchsstamm seit 2008 im betroffenen Klinikum endemisch war. Das erste Ausbruchs isolat wurde am 22. Juli 2011 (Isolat 233/12) isoliert, stellt aber nicht den Beginn des Ausbruches dar. Dies geht einher mit der wiederholten Dokumentation des Auftretens ESBL-produzierender *K. pneumoniae* bis hin ins Jahr 2009 in der mikrobiologischen Datenbank des Krankenhauses [85]. Basierend auf diesen Fakten ist anzunehmen, dass das Ausbruchsgeschehen retrospektiv deutlich größer war und über lange Zeit unentdeckt blieb.

#### 4.2.4 Transmissions-Modus und Pathogen-Reservoir

Die Darstellung der Ausbruchs isolate in einem Minimum-Spanning-Tree (Abbildung 3.11) zeigte, dass nahezu alle internen Knotenpunkte dieses Baumes von Patienten isolaten besetzt sind. Dies spricht deutlich für eine Patient-Patient-Übertragung. Wäre das Geschehen auf der betroffenen Station das Resultat einer wiederholten Einbringung des Erregers aus einer externen Quelle gewesen, könnte man eine deutlich höhere genetische Diversität der Ausbruchs isolate beobachten. Im Falle eines mehrfachen Einbringens des Erregers aus einer internen Punktquelle würde der MST eine sternförmige Struktur mit einem oder mehreren unbesetzten Verzweigungspunkten aufweisen. Der mit einem Stern markierte unbesetzte Verzweigungspunkt im MST spiegelt lediglich das Fehlen von Proben aus der Zeit zwischen 2009 und 2011 wieder (Abbildung 3.11). Ohne zusätzliche Isolate aus diesem Zeitraum können die Transmissions-Ereignisse innerhalb dieses Zeitraumes nicht geklärt werden. Ob die Aufspaltung in drei Klade durch Evolution während einer fortlaufenden endemischen Kolonisation der neonatologischen Station über Jahre hinweg, oder durch wiederholtes Einbringen des Stammes aufgetreten ist, bleibt somit unklar. Letzteres könnte durch den Eintrag von anderen Stationen des Krankenhauses geschehen sein, wo das Auftreten ESBL-

produzierende *K. pneumoniae* seit 2009 in der mikrobiologischen Datenbank dokumentiert ist, jedoch keine näheren Informationen über den Sequenztyp vorliegen.

Es konnte beim Personal der Station in den wiederholt durchgeführten Screening-Untersuchungen keinerlei ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* festgestellt werden [85] und damit der Verbreitungsvektor nicht eindeutig identifiziert werden. Dennoch ist es aufgrund der Tatsache, dass es sich bei den Patienten um Neugeborene handelt, und der damit verbundenen Immobilität, wahrscheinlich, dass eine personalvermittelte Übertragung des Ausbruchsstammes innerhalb der betroffenen neonatologischen Intensivstation von Patient zu Patient stattgefunden hat. Ebenso konnte der Ausbruchsstamm weder bei den Müttern der betroffenen Neugeborenen, noch bei Patienten anderer Stationen oder anderer Krankenhäuser detektiert werden [85]. Daher ist ein Einbringen des Ausbruchsstammes von außen auf die neonatologische Station unwahrscheinlich. Dies stärkt, gemeinsam mit der Rückdatierung des Ausbruches auf Anfang 2008, die Annahme eines seit mehreren Jahren endemischen Vorkommens des Ausbruchsstammes auf der neonatologischen Intensivstation.

Im Maximum-Likelihood- sowie im Minimum-Spanning-Tree der Ausbruchs isolate ist zu erkennen, dass die Kladen 2 und 3 sowohl vor der teilweisen Renovierung der Station im Zeitraum 5. November 2011 bis 9. Januar 2012 als auch danach präsent waren. Dies verdeutlicht die Ineffektivität dieses Versuches der Eindämmung des Ausbruches. Des Weiteren zeigt die Platzierung der Isolate aus 2012 in den Kladen 2 und 3 des MST, dass nach der Renovierung mindestens zwei Genotypen in die Station eingebracht wurden. Es stellt sich nun die Frage wo sich das Reservoir des Ausbruchsstammes befand.

In zwei Fällen (Patient 17, Patient 29) konnten Mehrfachisolate sequenziert werden, die sowohl vor als auch nach der Renovierung der Station gewonnen wurden und eine sehr enge genetische Verwandtschaft zeigen (Abbildung 3.10). Dies deutet darauf hin, dass diese Patienten fortlaufend mit dem Ausbruchsstamm kolonisiert waren. Sie könnten als Reservoir des Ausbruchsstammes gedient haben und diesen nach der Renovierung wieder auf die Station eingebracht haben. Ebenso besteht die Möglichkeit, dass nicht identifizierte Träger des Ausbruchsstammes, welche über den gesamten untersuchten Zeitraum unentdeckt geblieben waren, diesen nach ihrer Entlassung im Zuge eines erneuten Aufenthaltes in der Kinderklinik wieder eingebracht haben. Diese Theorie der dauerhaften Kolonisation wird von

Studien von Selden *et al.* und Lohr *et al.* unterstützt. In diesen wird von einer intestinalen Kolonisation mit *K. pneumoniae* ohne weitere Symptome berichtet [204, 205].

#### 4.2.5 Analyse von Umgebungsisolaten

Der Datensatz enthält fünf Sequenzen, welche aus Isolaten aus über 300 Proben der Umgebung der Neonaten auf der betroffenen Station gewonnen wurden. Diese Isolate zeigen eine enge genetische Verwandtschaft mit den Patientenisolaten. Drei dieser Isolate (Umgebung 01 von einer Windelwaage, Umgebung 04 von einem Schnuller, Umgebung 05 von einem Handschuh) sitzen im MST (Abbildung 3.11) an apikalen Positionen, d.h. ihnen kommt keine Bedeutung als potentielle Übertragungsquelle zu. Die Genome zweier Umgebungsisolate (Umgebung 02 von Schnuller, Umgebung 03 aus einem Kanülenabwurfbehälter) sind genetisch identisch zu mehreren Patientenisolaten. Logische Gründe für ein Szenario, in dem ein Schnuller und ein Abfallgefäß als Reservoir für den Ausbruchstamm auftreten, sind jedoch nicht denkbar.

#### 4.2.6 Genetische Diversität des Ausbruchs-Klons innerhalb einzelner Patienten

Von mehreren Patienten konnten in verschiedenen Zeitabständen Isolate gewonnen und sequenziert werden. Diese Isolate zeigen sehr unterschiedliche genetische Distanzen zueinander (Abbildung 3.10). Die Isolate der Patienten 16, 35, 34 und 29 weisen keine bis zwei SNPs im paarweisen Vergleich zueinander auf. Diese geringe Diversität innerhalb der Patienten ist mit der in dieser Arbeit ermittelten vergleichsweise niedrigen Evolutionsrate zu erklären. Die Isolate von Patient 17 und 12 weisen hingegen genetische Distanzen auf, die nicht ausschließlich durch zufällige Akkumulation von SNPs zu erklären sind. Die Isolate von Patient 17 unterschieden sich nach 129 Tagen in neun Positionen. Die Isolate von Patient 12 zeigten einen Unterschied von fünf SNPs nach 138 Tagen, weisen aber unterschiedliche Kladen-bestimmende SNPs auf. Espedido *et al.* stellten 2013 in einem OXA-48-produzierendem *K. pneumoniae*-Stamm eine Akkumulation von elf SNPs innerhalb einer 540-tägigen Kolonisation fest, was immer noch einer niedrigeren Evolutionsrate entspräche [206].

Ein Grund für derartige genetische Unterschiede könnte das Vorhandensein verschiedener Erreger-Genotypen innerhalb eines Patienten sein. In einer großen Erregerpopulation, wie z.B. im Falle einer Sepsis, sind innerhalb dieser Erregerpopulation verschiedene Genotypen vertreten. Bei einer wiederholten Probennahme können somit zu verschiedenen



Zeitpunkten verschieden Erreger-Genotypen extrahiert worden sein. Die Isolate beider Patienten stammen jedoch nicht aus Blutkulturen und Informationen über eine eventuelle Sepsis liegen nicht vor. Ein weiterer Grund könnte ebenso eine durch Selektionsdruck (z.B. Antibiotikagabe) beschleunigte Evolution sein. Daten zur Antibiotikagabe liegen für diese Patienten jedoch nicht vor.

Die Mehrfachisolate von Patient 12 (Isolat 233/12 und 307/12) sind sowohl im ML-Baum als auch im MST in unterschiedlichen Kladen lokalisiert. Das zeitlich früher (2011) gewonnene Isolat 12-1 clustert gemeinsam mit den in 2012 gewonnen Isolaten und das 2012 gewonnene Isolat 12-2 clustert gemeinsam mit den Isolaten aus 2011. Dies spricht für die erneute Einbringung des Erregers in die Kinderklinik nach der Renovierung. Um eine Verwechslung auszuschließen wurden beide Isolate erneut vom NRZ für Gram-negative Krankenhauserreger in Bochum angefordert. Die Kladen-bestimmenden SNPs konnten mittels PCR bestätigt werden. Somit kann eine Verwechslung ausgeschlossen werden.

#### 4.2.7 Fazit

Die Verwendung moderner Sequenziertechnologien sowie phylogenetischer Methoden ermöglichte es wertvolle Erkenntnisse über Beginn, Verlauf und Größe sowie die mögliche Art der Transmission des ESBL-bildenden *K. pneumoniae*-Stammes zu erlangen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Makrorestriktionsanalysen in komplexen Ausbruchsszenarios keine ausreichende Auflösung zur Unterscheidung ausbruchsassoziierter Isolate bieten. Die Ursachen für die Schwierigkeiten in der Eindämmung des beschriebenen Ausbruches könnten in der späten Erkennung und der unterschätzten Größe des Geschehens zu finden sein. Laut der vorliegenden Ergebnisse begann der Ausbruch gute drei Jahre vor der Identifikation des ersten Ausbruchsisolates am 22. Juli 2011. Bis dahin ist es, aufgrund eines fehlenden Screenings, sehr wahrscheinlich, dass Fälle von intestinaler Besiedlung mit dem Ausbruchsstamm unbemerkt blieben.

In verschiedenen Studien wurde bisher die Ganzgenom-Sequenzierung gemeinsam mit phylogenetischen Methoden (Maximum-Likelihood-Analysen, Bayes'sche statistische Verfahren) zur Aufarbeitung nosokomialer Ausbrüche verschiedener Pathogene, wie dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) oder *Mycobacterium tuberculosis*, genutzt [97, 98, 101, 207]. Im Jahr 2012 verwendeten Snitkin *et al.* erstmals Ganzgenom-Sequenzdaten zur Aufklärung eines Ausbruchs Carbapenem-resistenter *K. pneumoniae* auf

einer Intensivstation in den USA, verfolgten jedoch einen auf der Berechnung parsimonischer Transmissionswege basierenden Ansatz. In dieser Studie fanden jedoch keine phylogenetischen Methoden auf Basis von Maximum-Likelihood-Analysen oder Bayes'schen Verfahren Anwendung [99]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit, mittels dieser phylogenetischen Methoden, zwar keine direkten Transmissionswege aufgezeigt, jedoch eine Patient-Patient-Transmission belegt werden. Weiterhin konnte erstmals eine Nukleotid-Substitutionsrate für einen *K. pneumoniae*-Stamm berechnet, und mit Hilfe dieser der Beginn des untersuchten Ausbruches rückdatiert werden.

Die Makrorestriktionsanalyse der Ausbruchs isolate mittels *Xba*I-Verdau ermöglichte zwar die Zuordnung der *K. pneumoniae*-Isolate zum Ausbruch, jedoch sind die Subtypen über alle Klade n verteilt und spiegeln somit nicht die wirkliche genetische Verwandtschaft der Ausbruchs isolate wieder. Gerade große Plasmide nehmen Einfluss auf Restriktionsmuster und verzerren genetische Verwandtschaftsverhältnisse.

Moderne Methoden des *Next Generation Sequencing* bieten eine wertvolle Möglichkeit der Identifikation und Verfolgung von Ausbrüchen bakterieller Erreger. Der rasante technologische Fortschritt, die Verfügbarkeit der sogenannten *Benchtop* Sequenziergeräte und der sinkende Preis lässt die Methoden der Ganzgenomsequenzierung auch in kleinere Labore und Krankenhäuser Einzug halten. Dabei bietet diese keineswegs einen Ersatz klassischer epidemiologischer Methoden, wohl aber eine sinnvolle Ergänzung. Ohne epidemiologische Daten zu Genomsequenzen bleiben phylogenetische Analysen auf Basis von Genomdaten lediglich ein Gerüst.

Limitierend für den routinemäßigen Einsatz der Ganzgenomsequenzierung in Kliniken und Laboren bleibt weiterhin neben den Kosten die Speicherung, Verwaltung und Analyse der anfallenden Datenmengen. Diese stellt besondere Anforderungen an die IT-Infrastruktur was Speicherplatz und Rechenleistung anbelangt. Weiterhin wird versiertes Personal zur Analyse und informatischen sowie klinischen Interpretation der generierten Daten benötigt.

### 4.3 Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnten wertvolle Erkenntnisse zur Verbreitung von ESBL in Enterobacteriaceae in Deutschland erlangt werden. Ebenso gelang es den Nutzen der Genomsequenzierung für die Aufklärung nosokomialer Ausbrüche von Enterobacteriaceae weiter zu verdeutlichen. An einigen Stellen bedarf es nun weiterer detaillierterer Analysen.

---

Zur Identifikation der im humanen und nosokomialen Bereich verbreiteten *E. coli*-Sequenztypen wäre eine Typisierung der in dieser Arbeit untersuchten Isolate mittels MLST sinnvoll. Diese würde den Stammhintergrund, in welchem sich ESBL-Resistenzplasmide befinden näher, beleuchten. In direkter Zusammenarbeit mit veterinärmedizinischen Institutionen könnten auf Basis von Ganzgenomdaten die phylogenetischen Verhältnisse von Mensch- und Tier-assoziierten ESBL-*E. coli* im Detail untersucht werden. Damit könnten Erkenntnisse über Transmissionswege und auch die Richtung einer eventuellen Transmission zwischen Mensch und Tier gewonnen werden. Ebenso müsste eine genauere Analyse der entsprechenden Resistenzplasmide in veterinären und humanmedizinischen Isolaten erfolgen. Dies könnte mittels Plasmid-MLST oder aber der Sequenzierung von Plasmiden geschehen.

---

## Referenzen

1. **Fleming A.** *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae.* British journal of experimental pathology, **1929**. 10(3): p. 226.
2. **Hooper D & Rubinstein E.** *Quinolone antimicrobial agents*, ASM Press. Washington, DC, **2003**.
3. **Rubinstein E.** *History of quinolones and their side effects.* Chemotherapy, **2001**. 47(Suppl. 3): p. 3-8.
4. **Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ.** *How antibiotics kill bacteria: from targets to networks.* Nat Rev Microbiol, **2010**. 8(6): p. 423-35.
5. **Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X.** *Quinolone-mediated bacterial death.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **2008**. 52(2): p. 385-392.
6. **Chen C-R, Malik M, Snyder M, Drlica K.** *DNA gyrase and topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage.* Journal of molecular biology, **1996**. 258(4): p. 627-637.
7. **Davies J, Gorini L, Davies B.** *Misreading of RNA codewords induced by aminoglycoside antibiotics.* Molecular pharmacology, **1965**. 1(1): p. 93-106.
8. **Josephine HR, Kumar I, Pratt R.** *The perfect penicillin? Inhibition of a bacterial DD-peptidase by peptidoglycan-mimetic  $\beta$ -lactams.* Journal of the American Chemical Society, **2004**. 126(26): p. 8122-8123.
9. **Drawz SM & Bonomo RA.** *Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors.* Clinical microbiology reviews, **2010**. 23(1): p. 160-201.
10. **Hendlin D, Stapley E, Jackson M, Wallick H, Miller A, Wolf F, Miller T, Chalet L, Kahan F, Foltz E.** *Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomyces.* Science, **1969**. 166(3901): p. 122-123.
11. **Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH, Falagas ME.** *Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens.* J Antimicrob Chemother, **2012**. 67(2): p. 255-68.
12. **Skarzynski T, Mistry A, Wonacott A, Hutchinson SE, Kelly VA, Duncan K.** *Structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-N-acetylglucosamine and the drug fosfomycin.* Structure, **1996**. 4(12): p. 1465-74.
13. **Dwyer DJ, Camacho DM, Kohanski MA, Callura JM, Collins JJ.** *Antibiotic-induced bacterial cell death exhibits physiological and biochemical hallmarks of apoptosis.* Mol Cell, **2012**. 46(5): p. 561-72.

14. **Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ.** *A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics.* Cell, **2007**. 130(5): p. 797-810.
15. **Malouin F & Bryan L.** *Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1986**. 30(1): p. 1.
16. **Hartman BJ & Tomasz A.** *Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, **1984**. 158(2): p. 513-6.
17. **Utsui Y & Yokota T.** *Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, **1985**. 28(3): p. 397-403.
18. **Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T.** *Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance.* FEMS Microbiol Rev, **2008**. 32(2): p. 361-85.
19. **Li XZ, Zhang L, Poole K.** *Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of Pseudomonas aeruginosa.* J Antimicrob Chemother, **2000**. 45(4): p. 433-6.
20. **Livermore DM.** *Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbenicillin-resistant and -susceptible strains of Pseudomonas aeruginosa.* J Med Microbiol, **1984**. 18(2): p. 261-70.
21. **Livermore DM.** *Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems.* J Antimicrob Chemother, **2001**. 47(3): p. 247-50.
22. **Ford PJ & Avison MB.** *Evolutionary mapping of the SHV  $\beta$ -lactamase and evidence for two separate IS26-dependent blaSHV mobilization events from the Klebsiella pneumoniae chromosome.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2004**. 54(1): p. 69-75.
23. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** *Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother, **2002**. 46(1): p. 1-11.
24. **Richmond MH & Sykes RB.** *The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role.* Adv Microb Physiol, **1973**. 9: p. 31-88.
25. **Datta N & Kontomichalou P.** *Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae.* Nature, **1965**. 208(5007): p. 239-41.
26. **Matthew M.** *Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution.* J Antimicrob Chemother, **1979**. 5(4): p. 349-58.
27. **Livermore DM.** *beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance.* Clin Microbiol Rev, **1995**. 8(4): p. 557-84.
28. **Medeiros AA.** *Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics.* Clin Infect Dis, **1997**. 24 Suppl 1: p. S19-45.

- 
29. **Livermore DM.** *Defining an extended-spectrum beta-lactamase.* Clin Microbiol Infect, **2008.** 14 Suppl 1: p. 3-10.
  30. **Livermore DM.** *Clinical significance of beta-lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods.* Eur J Clin Microbiol, **1987.** 6(4): p. 439-45.
  31. **Sanders WE, Jr. & Sanders CC.** *Inducible beta-lactamases: clinical and epidemiologic implications for use of newer cephalosporins.* Rev Infect Dis, **1988.** 10(4): p. 830-8.
  32. **Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B.** *Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins.* Antimicrob Agents Chemother, **1985.** 28(2): p. 302-7.
  33. **Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, Perroux R, Cluzel R.** *Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase.* J Antimicrob Chemother, **1987.** 20(3): p. 323-34.
  34. **Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P.** *Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes.* Rev Infect Dis, **1988.** 10(4): p. 879-84.
  35. **Philippon A, Labia R, Jacoby G.** *Extended-spectrum beta-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother, **1989.** 33(8): p. 1131-6.
  36. **Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** *A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure.* Antimicrob Agents Chemother, **1995.** 39(6): p. 1211-33.
  37. **Bauernfeind A, Grimm H, Schweighart S.** *A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli.* Infection, **1990.** 18(5): p. 294-8.
  38. **Bernard H, Tancrede C, Livrelli V, Morand A, Barthelemy M, Labia R.** *A novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase not derived from TEM- or SHV-type enzymes.* J Antimicrob Chemother, **1992.** 29(5): p. 590-2.
  39. **Rodríguez MM, Power P, Radice M, Vay C, Famiglietti A, Galleni M, Ayala JA, Gutkind G.** *Chromosome-encoded CTX-M-3 from Kluyvera ascorbata: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **2004.** 48(12): p. 4895-4897.
  40. **Oliver A, Perez-Diaz JC, Coque TM, Baquero F, Canton R.** *Nucleotide sequence and characterization of a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-10) isolated in Spain.* Antimicrob Agents Chemother, **2001.** 45(2): p. 616-20.
  41. **Humeniuk C, Arlet G, Gautier V, Grimont P, Labia R, Philippon A.** *Beta-lactamases of Kluyvera ascorbata, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types.* Antimicrob Agents Chemother, **2002.** 46(9): p. 3045-9.

- 
42. **Poirel L, Kampfer P, Nordmann P.** *Chromosome-encoded Ambler class A beta-lactamase of Kluyvera georgiana, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases.* Antimicrob Agents Chemother, **2002**. 46(12): p. 4038-40.
  43. **Olson AB, Silverman M, Boyd DA, McGeer A, Willey BM, Pong-Porter V, Daneman N, Mulvey MR.** *Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from Kluyvera georgiana isolated in Guyana.* Antimicrob Agents Chemother, **2005**. 49(5): p. 2112-5.
  44. **Bonnet R.** *Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes.* Antimicrob Agents Chemother, **2004**. 48(1): p. 1-14.
  45. **Poirel L, Naas T, Guibert M, Chaibi EB, Labia R, Nordmann P.** *Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1999**. 43(3): p. 573-581.
  46. **Smith CJ, Bennett TK, Parker AC.** *Molecular and genetic analysis of the Bacteroides uniformis cephalosporinase gene, cblA, encoding the species-specific beta-lactamase.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1994**. 38(8): p. 1711-1715.
  47. **Rogers MB, Parker AC, Smith CJ.** *Cloning and characterization of the endogenous cephalosporinase gene, cepA, from Bacteroides fragilis reveals a new subgroup of Ambler class A beta-lactamases.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1993**. 37(11): p. 2391-2400.
  48. **Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R.** *Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1993**. 37(5): p. 962-969.
  49. **Philippon A, Arlet G, Jacoby GA.** *Plasmid-determined AmpC-type  $\beta$ -lactamases.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **2002**. 46(1): p. 1-11.
  50. **Wiedemann B, Dietz H, Pfeifle D.** *Induction of beta-lactamase in Enterobacter cloacae.* Clin Infect Dis, **1998**. 27 Suppl 1: p. S42-7.
  51. **Jacobs C, Frere JM, Normark S.** *Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible beta-lactam resistance in gram-negative bacteria.* Cell, **1997**. 88(6): p. 823-32.
  52. **Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S.** *Extended broad spectrum beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae including resistance to cephamycins.* Infection, **1989**. 17(5): p. 316-21.
  53. **Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S.** *Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin.* Jpn J Microbiol, **1968**. 12(4): p. 423-34.

- 
54. **Sykes R & Matthew M.** *The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **1976**. 2(2): p. 115-157.
55. **Mitsuhashi S & Inoue M.** *Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics.* Beta lactam antibiotics. New York: Springer Verlag, **1981**.
56. **Ambler RP.** *The structure of beta-lactamases.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, **1980**. 289(1036): p. 321-31.
57. **Bush K & Jacoby GA.** *Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases.* Antimicrobial Agents and chemotherapy, **2010**. 54(3): p. 969-976.
58. **Pfeifer Y.** *ESBL, AmpC und Carbapenemase: Vorkommen, Verbreitung und Diagnostik  $\beta$ -Lactamase-bildender Gram-negativer Krankheitserreger/ESBL, AmpC and carbapenemases: emergence, dissemination and diagnostics of  $\beta$ -lactamase-producing Gram-negative pathogens.* LaboratoriumsMedizin, **2010**. 34(4): p. 205-215.
59. **Sarria JC, Vidal AM, Kimbrough RC, 3rd.** *Infections caused by *Kluyvera* species in humans.* Clin Infect Dis, **2001**. 33(7): p. E69-74.
60. **D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM.** *CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance.* International Journal of Medical Microbiology, **2013**. 303(6): p. 305-317.
61. **Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P.** *ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in *Escherichia coli*.* Antimicrob Agents Chemother, **2005**. 49(1): p. 447-50.
62. **Lartigue MF, Poirel L, Aubert D, Nordmann P.** *In vitro analysis of ISEcp1B-mediated mobilization of naturally occurring beta-lactamase gene blaCTX-M of *Kluyvera ascorbata*.* Antimicrob Agents Chemother, **2006**. 50(4): p. 1282-6.
63. **Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N.** *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe.* J Antimicrob Chemother, **2007**. 59(2): p. 165-74.
64. **Bradford PA, Yang Y, Sahm D, Grope I, Gardovska D, Storch G.** *CTX-M-5, a Novel Cefotaxime-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase from an Outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **1998**. 42(8): p. 1980-1984.
65. **Cantón R, González-Alba JM, Galán JC.** *CTX-M enzymes: origin and diffusion.* Frontiers in microbiology, **2012**. 3.
66. **Vinue L, Saenz Y, Martinez S, Somalo S, Moreno M, Torres C, Zarazaga M.** *Prevalence and diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in faecal *Escherichia coli* isolates from healthy humans in Spain.* Clinical microbiology and infection, **2009**. 15(10): p. 954-956.



- 
67. **Geser N, Stephan R, Korczak BM, Beutin L, Hächler H.** *Molecular identification of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase genes from Enterobacteriaceae isolated from healthy human carriers in Switzerland.* Antimicrobial agents and chemotherapy, **2012**. 56(3): p. 1609-1612.
68. **Valenza G, Nickel S, Pfeifer Y, Eller C, Krupa E, Lehner-Reindl V, Holler C.** *Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli as intestinal colonizers in the German community.* Antimicrob Agents Chemother, **2013**.
69. **Canton R & Coque TM.** *The CTX-M beta-lactamase pandemic.* Curr Opin Microbiol, **2006**. 9(5): p. 466-75.
70. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.* J Antimicrob Chemother, **2011**. 66(1): p. 1-14.
71. **Morosini MI, Garcia-Castillo M, Coque TM, Valverde A, Novais A, Loza E, Baquero F, Canton R.** *Antibiotic coresistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline.* Antimicrob Agents Chemother, **2006**. 50(8): p. 2695-9.
72. **Carattoli A.** *Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae.* Antimicrob Agents Chemother, **2009**. 53(6): p. 2227-38.
73. **Carattoli A.** *Plasmids and the spread of resistance.* Int J Med Microbiol, **2013**. 303(6-7): p. 298-304.
74. **Kollek R, Oertel W, Goebel W.** *Isolation and characterization of the minimal fragment required for autonomous replication ("basic replicon") of a copy mutant (pKN102) of the antibiotic resistance factor R1.* Mol Gen Genet, **1978**. 162(1): p. 51-7.
75. **Novick RP.** *Plasmid incompatibility.* Microbiol Rev, **1987**. 51(4): p. 381-95.
76. **Hayes F.** *Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest.* Science, **2003**. 301(5639): p. 1496-9.
77. **Geffers C, Gastmeier P, Rüden H.** *Themenheft 8" Nosokomiale Infektionen".* **2002**.
78. **Behnke M, Hansen S, Leistner R, Diaz LAP, Gropmann A, Sohr D, Gastmeier P, Piening B.** *Nosokomiale Infektionen und Antibiotika-Anwendung.* **2013**.
79. **Breier A, Sohr D, Geffers C, Gastmeier P.** *Erreger nosokomialer Infektionen auf Intensivstation.* Intensivmedizin und Notfallmedizin, **2009**. 46(4): p. 220-227.
80. **Mattner F, Bange F-C, Meyer E, Seifert H, Wichelhaus TA, Chaberny IF.** *Prävention der Ausbreitung von multiresistenten gramnegativen Erregern. in Vorschläge eines Experten-Workshops der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. Dtsch Ärztebl.* **2012**.
81. **Coque TM, Baquero F, Canton R.** *Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe.* Euro Surveill, **2008**. 13(47).

- 
82. **Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO).** *Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen.* **2012.**
83. **Benenson S, Levin PD, Block C, Adler A, Ergaz Z, Peleg O, Minster N, Gross I, Schaffer K, Moses AE, Cohen MJ.** *Continuous surveillance to reduce extended-spectrum beta-lactamase Klebsiella pneumoniae colonization in the neonatal intensive care unit.* Neonatology, **2013.** 103(2): p. 155-60.
84. **Sumer S, Turk Dagi H, Findik D, Arslan U, Aktug Demir N, Ural O, Tuncer I.** *Two Outbreaks Due to Esbl-Producing Klebsiella Pneumoniae in A Neonatal Intensive Care Unit.* Pediatr Int, **2013.**
85. **Haller S, Eller C, Hermes J, Kaase M, Steglich M, Radonic A, Dabrowski V, Nitsche A, Pfeifer Y, Werner G, Wunderle W, Abu Sin M, Huppertz H, Eckmanns T, Nübel U.** *Outbreak of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae on a neonatal intensive care unit in Germany, 2009 to 2012 – evidence for person to person transmission provided by coherent epidemiological and molecular biological results.* in Vorbereitung, **2014.**
86. **Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH.** *Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective.* Clin Microbiol Infect, **2012.** 18(7): p. 646-55.
87. **Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munckhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ.** *Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains.* Clin Microbiol Infect, **2011.** 17(6): p. 873-80.
88. **Wu G, Day MJ, Mafura MT, Nunez-Garcia J, Fenner JJ, Sharma M, van Essen-Zandbergen A, Rodríguez I, Dierikx C, Kadlec K.** *Comparative Analysis of ESBL-Positive Escherichia coli Isolates from Animals and Humans from the UK, The Netherlands and Germany.* PloS one, **2013.** 8(9): p. e75392.
89. **Kola A, Kohler C, Pfeifer Y, Schwab F, Kuhn K, Schulz K, Balau V, Breitbach K, Bast A, Witte W, Gastmeier P, Steinmetz I.** *High prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany.* J Antimicrob Chemother, **2012.** 67(11): p. 2631-4.
90. **Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, Coque T.** *Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe.* Clinical Microbiology and Infection, **2008.** 14(s1): p. 144-153.
91. **Leistner R, Meyer E, Gastmeier P, Pfeifer Y, Eller C, Dem P, Schwab F.** *Risk factors associated with the community-acquired colonization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive Escherichia Coli. an exploratory case-control study.* PLoS One, **2013.** 8(9): p. e74323.

- 
92. **Leistner R, Sakellariou C, Gurntke S, Kola A, Steinmetz I, Kohler C, Pfeifer Y, Eller C, Gastmeier P, Schwab F.** *Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Escherichia coli from bloodstream infection.* Infect Drug Resist, **2014**. 7: p. 57-62.
93. **Eller C, Simon S, Miller T, Frick JS, Prager R, Rabsch W, Guerra B, Werner G, Pfeifer Y.** *Presence of beta-lactamases in extended-spectrum-cephalosporin-resistant Salmonella enterica of 30 different serovars in Germany 2005-11.* J Antimicrob Chemother, **2013**. 68(9): p. 1978-81.
94. **Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S.** *Multilocus sequence typing of Klebsiella pneumoniae nosocomial isolates.* J Clin Microbiol, **2005**. 43(8): p. 4178-82.
95. **Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG.** *Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258.* Antimicrob Agents Chemother, **2009**. 53(8): p. 3365-70.
96. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B.** *Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing.* J Clin Microbiol, **1995**. 33(9): p. 2233-9.
97. **Harris SR, Cartwright EJ, Török ME, Holden MT, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Ellington MJ, Quail MA, Bentley SD, Parkhill J.** *Whole-genome sequencing for analysis of an outbreak of methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a descriptive study.* The Lancet infectious diseases, **2013**. 13(2): p. 130-136.
98. **Nubel U, Nachtnebel M, Falkenhorst G, Benzler J, Hecht J, Kube M, Brocker F, Moelling K, Buhrer C, Gastmeier P, Piening B, Behnke M, Dehnert M, Layer F, Witte W, Eckmanns T.** *MRSA transmission on a neonatal intensive care unit: epidemiological and genome-based phylogenetic analyses.* PLoS One, **2013**. 8(1): p. e54898.
99. **Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, Stock F, Henderson DK, Palmore TN, Segre JA.** *Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae with whole-genome sequencing.* Science translational medicine, **2012**. 4(148): p. 148ra116-148ra116.
100. **Gardy JL, Johnston JC, Sui SJH, Cook VJ, Shah L, Brodtkin E, Rempel S, Moore R, Zhao Y, Holt R.** *Whole-genome sequencing and social-network analysis of a tuberculosis outbreak.* New England Journal of Medicine, **2011**. 364(8): p. 730-739.
101. **Török ME, Reuter S, Bryant J, Köser CU, Stinchcombe SV, Nazareth B, Ellington MJ, Bentley SD, Smith GP, Parkhill J.** *Rapid whole-genome sequencing for investigation of a suspected tuberculosis outbreak.* Journal of clinical microbiology, **2013**. 51(2): p. 611-614.

- 
102. **Drlica K, Zhao X, Malik M, Salz T, Kerns R.** *Fluoroquinolone Resistance: Mechanisms, Restrictive Dosing, and Anti-Mutant Screening Strategies for New Compounds*, in *Antibiotic Discovery and Development*. 2012, Springer. p. 485-514.
  103. **Eller C, Leistner R, Guerra B, Fischer J, Wendt C, Rabsch W, Werner G, Pfeifer Y.** *Emergence of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany*. J Antimicrob Chemother, **2014**. 69(2): p. 562-4.
  104. **Tuffs A.** *Poor hospital hygiene is blamed for deaths of three babies in Bremen*. Bmj, **2011**. 343: p. d7396.
  105. **Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC.** *Prevalence in the United States of *aac(6')-Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, **2006**. 50(11): p. 3953-5.
  106. **Garcia-Fernandez A, Chiaretto G, Bertini A, Villa L, Fortini D, Ricci A, Carattoli A.** *Multilocus sequence typing of *Incl1* plasmids carrying extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Salmonella* of human and animal origin*. J Antimicrob Chemother, **2008**. 61(6): p. 1229-33.
  107. **Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E.** *Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group*. Appl Environ Microbiol, **2000**. 66(10): p. 4555-8.
  108. **Grobner S, Linke D, Schutz W, Fladerer C, Madlung J, Autenrieth IB, Witte W, Pfeifer Y.** *Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany*. J Med Microbiol, **2009**. 58(Pt 7): p. 912-22.
  109. **Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W.** **Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M beta-lactamase, Germany*. Emerg Infect Dis, **2009**. 15(9): p. 1533-5.
  110. **Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ.** *Identification of plasmids by PCR-based replicon typing*. J Microbiol Methods, **2005**. 63(3): p. 219-28.
  111. **Rutherford K, Parkhill J, Crook J, Horsnell T, Rice P, Rajandream M-A, Barrell B.** *Artemis: sequence visualization and annotation*. Bioinformatics, **2000**. 16(10): p. 944-945.
  112. **Drummond AJ & Rambaut A.** *BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees*. BMC Evol Biol, **2007**. 7: p. 214.
  113. **Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A.** *Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7*. Mol Biol Evol, **2012**. 29(8): p. 1969-73.
  114. **Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ.** *Basic local alignment search tool*. J Mol Biol, **1990**. 215(3): p. 403-10.
  115. **Li H & Durbin R.** *Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform*. Bioinformatics, **2010**. 26(5): p. 589-95.

- 
116. **Myers EW, Sutton GG, Delcher AL, Dew IM, Fasulo DP, Flanigan MJ, Kravitz SA, Mobarry CM, Reinert KH, Remington KA, Anson EL, Bolanos RA, Chou HH, Jordan CM, Halpern AL, Lonardi S, Beasley EM, Brandon RC, Chen L, Dunn PJ, Lai Z, Liang Y, Nusskern DR, Zhan M, Zhang Q, Zheng X, Rubin GM, Adams MD, Venter JC.** *A whole-genome assembly of Drosophila*. Science, **2000**. 287(5461): p. 2196-204.
117. **Librado P & Rozas J.** *DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data*. Bioinformatics, **2009**. 25(11): p. 1451-2.
118. **Feil EJ & Enright MC.** *Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens*. Curr Opin Microbiol, **2004**. 7(3): p. 308-13.
119. **Darling AE, Mau B, Perna NT.** *progressiveMauve: multiple genome alignment with gene gain, loss and rearrangement*. PLoS One, **2010**. 5(6): p. e11147.
120. **Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S.** *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. Mol Biol Evol, **2007**. 24(8): p. 1596-9.
121. **Rambaut A.** *Path-O-Gen: Temporal Signal Investigation Tool. Version 1.3.* **2010**, Edinburgh, UK: Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh.
122. **Wilgenbusch JC & Swofford D.** *Inferring evolutionary trees with PAUP\**. Curr Protoc Bioinformatics, **2003**. Chapter 6: p. Unit 6.4.
123. **Zhou Y, Liang Y, Lynch KH, Dennis JJ, Wishart DS.** *PHAST: a fast phage search tool*. Nucleic Acids Res, **2011**. 39(Web Server issue): p. W347-52.
124. **Rozen S & Skaletsky H.** *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, **2000**. 132: p. 365-86.
125. **Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O.** *The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology*. BMC Genomics, **2008**. 9: p. 75.
126. **Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R.** *The Sequence Alignment/Map format and SAMtools*. Bioinformatics, **2009**. 25(16): p. 2078-9.
127. **Gouy M, Guindon S, Gascuel O.** *SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building*. Mol Biol Evol, **2010**. 27(2): p. 221-4.
128. **Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.** *SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing*. J Comput Biol, **2012**. 19(5): p. 455-77.

- 
129. **Huson DH & Bryant D.** *Application of phylogenetic networks in evolutionary studies.* Mol Biol Evol, **2006**. 23(2): p. 254-67.
130. **Koboldt DC, Zhang Q, Larson DE, Shen D, McLellan MD, Lin L, Miller CA, Mardis ER, Ding L, Wilson RK.** *VarScan 2: somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing.* Genome Res, **2012**. 22(3): p. 568-76.
131. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).** *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.* www.eucast.org, **Version 4.0, 2014**.
132. **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).** *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22.* CLSI, Wayne, PA, USA, **2012**.
133. **Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning.* Vol. 2. **1989**: Cold spring harbor laboratory press New York.
134. **Macrina FL, Kopecko DJ, Jones KR, Ayers DJ, McCowen SM.** *A multiple plasmid-containing Escherichia coli strain: Convenient source of size reference plasmid molecules.* Plasmid, **1978**. 1(3): p. 417-420.
135. **Itoh Y, Nagano I, Kunishima M, Ezaki T.** *Laboratory investigation of enteroaggregative Escherichia coli O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness.* Journal of clinical microbiology, **1997**. 35(10): p. 2546-2550.
136. **Gautom RK.** *Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day.* J Clin Microbiol, **1997**. 35(11): p. 2977-80.
137. **Hunter SB, Vauterin P, Lambert-Fair MA, Van Duyne MS, Kubota K, Graves L, Wrigley D, Barrett T, Ribot E.** *Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard.* Journal of Clinical Microbiology, **2005**. 43(3): p. 1045-1050.
138. **Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ.** *A general method for detecting and sizing large plasmids.* Anal Biochem, **1995**. 226(2): p. 235-40.
139. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, Wieler LH, Karch H, Reeves PR, Maiden MC, Ochman H.** *Sex and virulence in Escherichia coli: an evolutionary perspective.* Molecular microbiology, **2006**. 60(5): p. 1136-1151.
140. **Jolley KA & Maiden MC.** *BIGSdb: Scalable analysis of bacterial genome variation at the population level.* BMC Bioinformatics, **2010**. 11: p. 595.
141. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings of the National Academy of Sciences, **1977**. 74(12): p. 5463-5467.

- 
142. **Ronaghi M, Uhlen M, Nyrén P.** *A sequencing method based on real-time pyrophosphate.* Science, **1998**. 281(5375): p. 363-365.
143. **Shendure J & Ji H.** *Next-generation DNA sequencing.* Nature biotechnology, **2008**. 26(10): p. 1135-1145.
144. **Wu KM, Li LH, Yan JJ, Tsao N, Liao TL, Tsai HC, Fung CP, Chen HJ, Liu YM, Wang JT, Fang CT, Chang SC, Shu HY, Liu TT, Chen YT, Shiao YR, Lauderdale TL, Su IJ, Kirby R, Tsai SF.** *Genome sequencing and comparative analysis of Klebsiella pneumoniae NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis.* J Bacteriol, **2009**. 191(14): p. 4492-501.
145. **Felsenstein J.** *Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach.* Journal of molecular evolution, **1981**. 17(6): p. 368-376.
146. **Jombart T, Eggo RM, Dodd PJ, Balloux F.** *Reconstructing disease outbreaks from genetic data: a graph approach.* Heredity (Edinb), **2011**. 106(2): p. 383-90.
147. **Fiett J, Palucha A, Miaczynska B, Stankiewicz M, Przondo-Mordarska H, Hryniewicz W, Gniadkowski M.** *A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a Klebsiella pneumoniae isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiellae.* Antimicrob Agents Chemother, **2000**. 44(6): p. 1499-505.
148. **Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P.** *Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization.* PLoS One, **2009**. 4(3): p. e4982.
149. **Brolund A, Edquist PJ, Makitalo B, Olsson-Liljequist B, Soderblom T, Wisell KT, Giske CG.** *Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in Sweden 2007-2011.* Clin Microbiol Infect, **2013**.
150. **Arpin C, Quentin C, Grobost F, Cambau E, Robert J, Dubois V, Coulange L, Andre C.** *Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting.* J Antimicrob Chemother, **2009**. 63(6): p. 1205-14.
151. **Livermore DM.** *Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens.* Korean J Intern Med, **2012**. 27(2): p. 128-42.
152. **Zheng H, Zeng Z, Chen S, Liu Y, Yao Q, Deng Y, Chen X, Lv L, Zhuo C, Chen Z.** *Prevalence and characterisation of CTX-M  $\beta$ -lactamases amongst Escherichia coli isolates from healthy food animals in China.* International journal of antimicrobial agents, **2012**. 39(4): p. 305-310.
153. **Liu B-T, Yang Q-E, Li L, Sun J, Liao X-P, Fang L-X, Yang S-S, Deng H, Liu Y-H.** *Dissemination and Characterization of Plasmids Carrying oqxAB-blaCTX-M Genes in Escherichia coli Isolates from Food-Producing Animals.* PloS one, **2013**. 8(9): p. e73947.

- 
154. **Hu Y-Y, Cai J-C, Zhou H-W, Chi D, Zhang X-F, Chen W-L, Zhang R, Chen G-X.** *Molecular Typing of CTX-M-Producing Escherichia coli Isolates from Environmental Water, Swine Feces, Specimens from Healthy Humans, and Human Patients.* Applied and environmental microbiology, **2013**. 79(19): p. 5988-5996.
155. **Johnson JR & Stell AL.** *Extended virulence genotypes of Escherichia coli strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise.* Journal of Infectious Diseases, **2000**. 181(1): p. 261-272.
156. **Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL.** *Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2011**. 66(1): p. 1-14.
157. **Petty NK, Ben Zakour NL, Stanton-Cook M, Skippington E, Totsika M, Forde BM, Phan MD, Gomes Moriel D, Peters KM, Davies M, Rogers BA, Dougan G, Rodriguez-Bano J, Pascual A, Pitout JD, Upton M, Paterson DL, Walsh TR, Schembri MA, Beatson SA.** *Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone.* Proc Natl Acad Sci U S A, **2014**.
158. **Arvand M, Moser V, Pfeifer Y.** *Prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli and spread of the epidemic clonal lineage ST131 in nursing homes in Hesse, Germany.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2013**. 68(11): p. 2686-2688.
159. **Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W.** *A novel IS26 structure surrounds blaCTX-M genes in different plasmids from German clinical Escherichia coli isolates.* J Med Microbiol, **2010**. 59(Pt 5): p. 580-7.
160. **Rüden H, Gastmeier P, Wischnewski N, Kampf G, Daschner F, Schlingmann J, Schumacher M, Rüden H.** *Prävalenz der wichtigsten nosokomialen Infektionen in Deutschland.* Bundesgesundheitsblatt, **1997**. 40(5): p. 198-203.
161. **Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G.** *The CTX-M-15-producing Escherichia coli diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup.* Journal of antimicrobial chemotherapy, **2008**. 61(5): p. 1024-1028.
162. **Nicolas-Chanoine M-H, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Caniça MM, Park Y-J, Lavigne J-P, Pitout J, Johnson JR.** *Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25: H4-ST131 producing CTX-M-15.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2008**. 61(2): p. 273-281.
163. **Nordmann P & Poirel L.** *Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **2005**. 56(3): p. 463-469.
164. **Rice LB.** *Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to beta-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones.* Mayo Clin Proc, **2012**. 87(2): p. 198-208.



- 
165. **European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC).** *Annual Epidemiological Report 2013*. Stockholm: ECDC, **2013**.
166. **Rodriguez I, Barownick W, Helmuth R, Mendoza MC, Rodicio MR, Schroeter A, Guerra B.** *Extended-spectrum {beta}-lactamases and AmpC {beta}-lactamases in ceftiofur-resistant Salmonella enterica isolates from food and livestock obtained in Germany during 2003-07*. J Antimicrob Chemother, **2009**. 64(2): p. 301-9.
167. **European Food Safety Authority (EFSA).** *Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "Salmonella Typhimurium-like" strains*. EFSA Journal **2010**. ;8(10):1826 [48 pp.].
168. **Arlet G, Barrett TJ, Butaye P, Cloeckaert A, Mulvey MR, White DG.** *Salmonella resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology*. Microbes Infect, **2006**. 8(7): p. 1945-54.
169. **Pardos de la Gandara M, Seral C, Castillo Garcia J, Rubio Calvo C, Weill FX.** *Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing Salmonella enterica isolates in Saragossa, Spain (2001-2008)*. Microb Drug Resist, **2011**. 17(2): p. 207-13.
170. **Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, Sirot J.** *A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil*. Antimicrob Agents Chemother, **2000**. 44(7): p. 1936-42.
171. **Garcia-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, Algorta G, Gutkind G, Ayala JA, Vignoli R.** *Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay*. J Antimicrob Chemother, **2011**. 66(8): p. 1725-9.
172. **Jouini A, Vinue L, Slama KB, Saenz Y, Klibi N, Hammami S, Boudabous A, Torres C.** *Characterization of CTX-M and SHV extended-spectrum beta-lactamases and associated resistance genes in Escherichia coli strains of food samples in Tunisia*. J Antimicrob Chemother, **2007**. 60(5): p. 1137-41.
173. **Lewis JS, 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH.** *First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system*. Antimicrob Agents Chemother, **2007**. 51(11): p. 4015-21.
174. **Peirano G, Laupland KB, Gregson DB, Pitout JD.** *Colonization of returning travelers with CTX-M-producing Escherichia coli*. J Travel Med, **2011**. 18(5): p. 299-303.
175. **Vinue L, Saenz Y, Martinez S, Somalo S, Moreno MA, Torres C, Zarazaga M.** *Prevalence and diversity of extended-spectrum beta-lactamases in faecal Escherichia coli isolates from healthy humans in Spain*. Clin Microbiol Infect, **2009**. 15(10): p. 954-7.

- 
176. **Schmid A, Hormansdorfer S, Messelhausser U, Kasbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R.** *Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli on bavarian dairy and beef cattle farms.* Appl Environ Microbiol, **2013**. 79(9): p. 3027-32.
177. **Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U.** *Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing Escherichia coli at German broiler chicken fattening farms.* Appl Environ Microbiol, **2013**. 79(16): p. 4815-20.
178. **Horton RA, Randall LP, Snary EL, Cockrem H, Lotz S, Wearing H, Duncan D, Rabie A, McLaren I, Watson E, La Ragione RM, Coldham NG.** *Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum {beta}-lactamase-producing escherichia coli in cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production.* Appl Environ Microbiol, **2011**. 77(11): p. 3715-9.
179. **Reich F, Atanassova V, Klein G.** *Extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany.* Emerg Infect Dis, **2013**. 19(8): p. 1253-9.
180. **Egervarn M, Borjesson S, Byfors S, Finn M, Kaipe C, Englund S, Lindblad M.** *Escherichia coli with extended-spectrum beta-lactamases or transferable AmpC beta-lactamases and Salmonella on meat imported into Sweden.* Int J Food Microbiol, **2014**. 171: p. 8-14.
181. **Geser N, Stephan R, Hachler H.** *Occurrence and characteristics of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk.* BMC Vet Res, **2012**. 8: p. 21.
182. **Borjesson S, Bengtsson B, Jernberg C, Englund S.** *Spread of extended-spectrum beta-lactamase producing Escherichia coli isolates in Swedish broilers mediated by an incl plasmid carrying bla(CTX-M-1).* Acta Vet Scand, **2013**. 55: p. 3.
183. **Ewers C, Bethe A, Stamm I, Grobbel M, Kopp PA, Guerra B, Stubbe M, Doi Y, Zong Z, Kola A, Schaufler K, Semmler T, Fruth A, Wieler LH, Guenther S.** *CTX-M-15-D-ST648 Escherichia coli from companion animals and horses: another pandemic clone combining multiresistance and extraintestinal virulence?* J Antimicrob Chemother, **2014**.
184. **Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P.** *Broad-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health.* FEMS Microbiol Rev, **2010**. 34(3): p. 295-316.
185. **Ewers C, Grobbel M, Stamm I, Kopp PA, Diehl I, Semmler T, Fruth A, Beutlich J, Guerra B, Wieler LH.** *Emergence of human pandemic O25: H4-ST131 CTX-M-15 extended-spectrum-β-lactamase-producing Escherichia coli among companion animals.* Journal of antimicrobial chemotherapy, **2010**. 65(4): p. 651-660.

- 
186. **Stolle I, Prenger-Berninghoff E, Stamm I, Scheufen S, Hassdenteufel E, Guenther S, Bethe A, Pfeifer Y, Ewers C.** *Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in dogs.* J Antimicrob Chemother, **2013**. 68(12): p. 2802-8.
187. **Mather AE, Reid SW, Maskell DJ, Parkhill J, Fookes MC, Harris SR, Brown DJ, Coia JE, Mulvey MR, Gilmour MW, Petrovska L, de Pinna E, Kuroda M, Akiba M, Izumiya H, Connor TR, Suchard MA, Lemey P, Mellor DJ, Haydon DT, Thomson NR.** *Distinguishable epidemics of multidrug-resistant Salmonella Typhimurium DT104 in different hosts.* Science, **2013**. 341(6153): p. 1514-7.
188. **Lemmenmeier E, Kohler P, Bruderer T, Goldenberger D, Kleger GR, Schlegel M.** *First documented outbreak of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in Switzerland: infection control measures and clinical management.* Infection, **2014**.
189. **Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, Paul A, Saner F, Buer J, Rath P.** *Outbreak due to a Klebsiella pneumoniae strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011.* Euro Surveill, **2011**. 16(33).
190. **Sumer S, Turk Dagi H, Findik D, Arslan U, Aktug Demir N, Ural O, Tuncer I.** *Two outbreaks of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit.* Pediatr Int, **2013**.
191. **Wendt C, Schutt S, Dalpke AH, Konrad M, Mieth M, Trierweiler-Hauke B, Weigand MA, Zimmermann S, Biehler K, Jonas D.** *First outbreak of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing K. pneumoniae in Germany.* Eur J Clin Microbiol Infect Dis, **2010**. 29(5): p. 563-70.
192. **Benenson S, Levin PD, Block C, Adler A, Ergaz Z, Peleg O, Minster N, Gross I, Schaffer K, Moses AE.** *Continuous surveillance to reduce extended-spectrum  $\beta$ -lactamase Klebsiella pneumoniae colonization in the neonatal intensive care unit.* Neonatology, **2012**. 103(2): p. 155-160.
193. **Gastmeier P, Loui A, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Zuschneid I, Sohr D, Behnke M, Obladen M, Vonberg R-P, Rüden H.** *Outbreaks in neonatal intensive care units—they are not like others.* American journal of infection control, **2007**. 35(3): p. 172-176.
194. **Harris AD, McGregor JC, Johnson JA, Strauss SM, Moore AC, Standiford HC, Hebden JN, Morris Jr JG.** *Risk Factors for Colonization with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase--Producing Bacteria and Intensive Care Unit Admission.* Emerging infectious diseases, **2007**. 13(8).
195. **Fouts DE, Tyler HL, DeBoy RT, Daugherty S, Ren Q, Badger JH, Durkin AS, Huot H, Shrivastava S, Kothari S, Dodson RJ, Mohamoud Y, Khouri H, Roesch LF, Krogfelt KA, Struve C, Triplett EW, Methe BA.** *Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte Klebsiella pneumoniae 342 and virulence predictions verified in mice.* PLoS Genet, **2008**. 4(7): p. e1000141.

- 
196. **Liu P, Li P, Jiang X, Bi D, Xie Y, Tai C, Deng Z, Rajakumar K, Ou H-Y.** *Complete genome sequence of Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum.* Journal of bacteriology, **2012**. 194(7): p. 1841-1842.
197. **Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A.** *Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants.* J Antimicrob Chemother, **2010**. 65(12): p. 2518-29.
198. **Woodford N.** *Successful, multiresistant bacterial clones.* J Antimicrob Chemother, **2008**. 61(2): p. 233-4.
199. **He M, Miyajima F, Roberts P, Ellison L, Pickard DJ, Martin MJ, Connor TR, Harris SR, Fairley D, Bamford KB, D'Arc S, Brazier J, Brown D, Coia JE, Douce G, Gerding D, Kim HJ, Koh TH, Kato H, Senoh M, Louie T, Michell S, Butt E, Peacock SJ, Brown NM, Riley T, Songer G, Wilcox M, Pirmohamed M, Kuijper E, Hawkey P, Wren BW, Dougan G, Parkhill J, Lawley TD.** *Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated Clostridium difficile.* Nat Genet, **2013**. 45(1): p. 109-13.
200. **Roetzer A, Diel R, Kohl TA, Ruckert C, Nubel U, Blom J, Wirth T, Jaenicke S, Schuback S, Rusch-Gerdes S, Supply P, Kalinowski J, Niemann S.** *Whole genome sequencing versus traditional genotyping for investigation of a Mycobacterium tuberculosis outbreak: a longitudinal molecular epidemiological study.* PLoS Med, **2013**. 10(2): p. e1001387.
201. **Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, Connor TR, Lee JH, Kariuki S, Croucher NJ, Choi SY, Harris SR, Lebens M, Niyogi SK, Kim EJ, Ramamurthy T, Chun J, Wood JL, Clemens JD, Czerkinsky C, Nair GB, Holmgren J, Parkhill J, Dougan G.** *Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic.* Nature, **2011**. 477(7365): p. 462-5.
202. **Harris SR, Feil EJ, Holden MT, Quail MA, Nickerson EK, Chantratita N, Gardete S, Tavares A, Day N, Lindsay JA, Edgeworth JD, de Lencastre H, Parkhill J, Peacock SJ, Bentley SD.** *Evolution of MRSA during hospital transmission and intercontinental spread.* Science, **2010**. 327(5964): p. 469-74.
203. **Nubel U, Dordel J, Kurt K, Strommenger B, Westh H, Shukla SK, Zemlickova H, Leblois R, Wirth T, Jombart T, Balloux F, Witte W.** *A timescale for evolution, population expansion, and spatial spread of an emerging clone of methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* PLoS Pathog, **2010**. 6(4): p. e1000855.
204. **Lohr IH, Rettedal S, Natas OB, Naseer U, Oymar K, Sundsfjord A.** *Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae following a nosocomial outbreak.* J Antimicrob Chemother, **2013**. 68(5): p. 1043-8.
205. **Selden R, Lee S, Wang WL, Bennett JV, Eickhoff TC.** *Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir.* Ann Intern Med, **1971**. 74(5): p. 657-64.

- 
206. **Espedido BA, Steen JA, Ziochos H, Grimmond SM, Cooper MA, Gosbell IB, van Hal SJ, Jensen SO.** *Whole genome sequence analysis of the first Australian OXA-48-producing outbreak-associated Klebsiella pneumoniae isolates: the resistome and in vivo evolution.* PloS one, **2013**. 8(3): p. e59920.
207. **Köser CU, Holden MT, Ellington MJ, Cartwright EJ, Brown NM, Ogilvy-Stuart AL, Hsu LY, Chewapreecha C, Croucher NJ, Harris SR.** *Rapid whole-genome sequencing for investigation of a neonatal MRSA outbreak.* New England Journal of Medicine, **2012**. 366(24): p. 2267-2275.

## Anhang I: Bakterielle Isolate

Tabelle A1: ambulante ESBL-*E. coli* Isolate aus dem Charité Universitätsklinikum Berlin

Studien-ID	Charité-Nr.	Datum der Isolation	Material	Alter	Geschlecht	PLZ-Bereich	ESBL-Typ	β-Laktamasen	PMQR	Phylogenet. Gruppe
RS031	REV-1009	09.05.2011	Rektalabstrich	65	männlich	13	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS032	REV-1010	12.05.2011	Rektalabstrich	91	männlich	10	CTX-M-15	TEM-1	aac(6')1b-cr	B2
RS033	REV-1011	12.05.2011	Rektalabstrich	86	weiblich	12	CTX-M-1	TEM-1		D
RS034	REV-1020	02.05.2011	Urin	70	weiblich	13	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	A
RS038	REV-1035	20.05.2011	Rektalabstrich	70	männlich	14	CTX-M-1	TEM-1		B1
RS039	REV-1040	23.05.2011	Rektalabstrich	56	männlich	13	CTX-M-1	TEM-1		A
RS040	REV-1059	14.06.2011	Rektalabstrich	70	männlich	10	CTX-M-2	TEM-1		A
RS041	REV-1064	17.06.2011	Rektalabstrich	76	weiblich	14	CTX-M-2	TEM-1		B1
RS042	REV-1036	10.05.2011	Gewebe	44	weiblich	14	SHV-12	TEM-1		A
RS043	REV-1045	22.05.2011	Urin	73	weiblich	10	CTX-M-1	TEM-1		B2
RS044	REV-1066	21.06.2011	Rektalabstrich	23	weiblich	12	CTX-M-1			B2
RS045	REV-1073	05.07.2011	Rektalabstrich	73	weiblich	12	CTX-M-14			B2
RS046	REV-1074	05.07.2011	Rektalabstrich	81	weiblich	13	CTX-M-1			D
RS047	REV-1080	14.07.2011	Rektalabstrich	74	weiblich	10	CTX-M-1			B1
RS048	REV-1081	18.07.2011	Rektalabstrich	78	männlich	16	CTX-M-1	TEM-1		B2
RS049	REV-1082	15.07.2011	Rektalabstrich	53	männlich	13	CTX-M-15			D
RS050	REV-1083	15.07.2011	Urin	58	weiblich	10	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS051	REV-1084	15.07.2011	Urin	74	weiblich	12	CTX-M-1			B1
RS053	REV-1094	27.07.2011	Rektalabstrich	64	weiblich	14	CTX-M-1			B1
RS054	REV-1095	27.07.2011	Urin	58	weiblich	12	CTX-M-1			D
RS055	REV-1097	28.07.2011	Rektalabstrich	76	weiblich	12	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS056	REV-1098	29.07.2011	Rektalabstrich	63	weiblich	13	CTX-M-15			D
RS057	REV-1101	01.08.2011	Urin	64	weiblich	10	CTX-M-1			A
RS058	REV-1106	03.08.2011	Rektalabstrich	64	männlich	12	CTX-M-15	TEM-1		B2
RS059	REV-1115	08.08.2011	Rektalabstrich	77	weiblich	12	CTX-M-1			A
RS060	REV-1117	09.08.2011	Rektalabstrich	68	weiblich	12	CTX-M-14			B2
RS061	REV-1120	11.08.2011	Urin	72	weiblich	14	CTX-M-14			D
RS062	REV-1125	16.08.2011	Rektalabstrich	27	weiblich	10	CTX-M-15			B2
RS063	REV-1126	16.08.2011	Rektalabstrich	72	weiblich	15	CTX-M-15	TEM-1		B2
RS064	REV-1127	16.08.2011	Rektalabstrich	68	weiblich	13	CTX-M-32			B1
RS207	REV-1129	19.08.2011	Rektalabstrich	80	männlich	13	CTX-M-1			B1
RS208	REV-1130	19.08.2011	Rektalabstrich	27	männlich	12	CTX-M-14			D
RS209	REV-1132	22.08.2011	Rektalabstrich	54	männlich	16	TEM-52c			D
RS210	REV-1141	25.08.2011	Rektalabstrich	54	weiblich	10	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS211	REV-1144	19.08.2011	Rektalabstrich	31	weiblich	12	CTX-M-1			B1
RS212	REV-1147	24.08.2011	Rektalabstrich	37	männlich	12	CTX-M-2			A
RS213	REV-1148	20.08.2011	Urin	49	männlich	15	CTX-M-8	TEM-1		B1
RS214	REV-1151	01.09.2011	Rektalabstrich	53	männlich	12	CTX-M-2			B1
RS215	REV-1152	02.09.2011	Rektalabstrich	53	männlich	13	CTX-M-14			D
RS216	REV-1156	02.09.2011	Rektalabstrich	56	weiblich	12	CTX-M-14			B1
RS217	REV-1160	13.09.2011	Rektalabstrich	59	männlich	12	CTX-M-1			B2
RS218	REV-1161	15.09.2011	Rektalabstrich	75	männlich	39	CTX-M-15			B1
RS219	REV-1162	12.09.2011	Urin	65	weiblich	10	CTX-M-15			B1
RS220	REV-1163	14.09.2011	Rektalabstrich	48	männlich	74	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS222	REV-1165	21.09.2011	Rektalabstrich	54	männlich	13	CTX-M-14			B2
RS223	REV-1166	19.09.2011	Rektalabstrich	47	weiblich	10	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	D
RS224	REV-1167	23.09.2011	Rektalabstrich	62	männlich	14	CTX-M-15			B2
RS225	REV-1168	26.09.2011	Rektalabstrich	68	männlich	15	CTX-M-1			B1
RS226	REV-1169	27.09.2011	Rektalabstrich	72	weiblich	15	CTX-M-1			B1
RS227	REV-1172	27.09.2011	Rektalabstrich	57	weiblich	14	CTX-M-14			B2
RS228	REV-1178	07.09.2011	Urin	73	männlich	14	CTX-M-14	TEM-1		B1
RS229	REV-1181	27.09.2011	Rektalabstrich	1	männlich	12	CTX-M-1	TEM-1		B1
RS233	REV-1182	29.09.2011	Urin	57	weiblich	16	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	A
RS234	REV-1183	28.09.2011	Rektalabstrich	73	männlich	14	CTX-M-1			A
RS235	REV-1184	15.09.2011	Rektalabstrich	67	männlich	16	CTX-M-1	TEM-1		B2
RS236	REV-1185	19.05.2011	Urin	69	weiblich	16	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS237	REV-1190	10.10.2011	Rektalabstrich	30	weiblich	13	CTX-M-15			D
RS238	REV-1195	06.10.2011	Rektalabstrich	30	männlich	95	CTX-M-15		aac(6')1b-cr	B2
RS239	REV-1197	07.10.2011	Urin	83	weiblich	39	CTX-M-14	TEM-1		D
RS240	REV-1198	10.10.2011	Rektalabstrich	78	männlich	10	CTX-M-15			B2
RS241	REV-1201	18.10.2011	Rektalabstrich	63	weiblich	12	CTX-M-55			A
RS242	REV-1206	18.10.2011	Rektalabstrich	18	weiblich	12	CTX-M-1	TEM-1		D
RS243	REV-1213	28.10.2011	Rektalabstrich	31	weiblich	10	CTX-M-27			B2
RS244	REV-1215	26.10.2011	Rektalabstrich	37	männlich	04	CTX-M-27			B2
RS245	REV-1222	07.11.2011	Rektalabstrich	60	weiblich	10	CTX-M-1			B2
RS246	REV-1224	31.10.2011	Rektalabstrich	83	männlich	14	CTX-M-1	TEM-1		A
RS247	REV-1240	11.11.2011	Urin	82	weiblich	13	CTX-M-1			D

RS248	REV-1241	10.11.2011	Rektalabstrich	70	männlich	14	CTX-M-14		D
RS249	REV-1245	13.11.2011	Urin	53	männlich	13	CTX-M-1	TEM-1	B2
RS250	REV-1246	22.11.2011	Rektalabstrich	36	weiblich	12	CTX-M-1	TEM-1	D
RS252	REV-1252	30.11.2011	Urin	55	männlich	12	CTX-M-15		B2
RS253	REV-1257	05.12.2011	Rektalabstrich	53	männlich	06	CTX-M-1		B1
RS254	REV-1258	09.12.2011	Rektalabstrich	83	männlich	13	CTX-M-15		A
RS255	REV-1261	02.12.2011	Rektalabstrich	62	weiblich	13	CTX-M-1		B1
RS256	REV-1262	06.12.2011	Rektalabstrich	76	weiblich	12	CTX-M-1		B2
RS257	REV-1263	07.12.2011	Rektalabstrich	72	männlich	12	CTX-M-15	aac(6')1b-cr	B2
RS258	REV-1264	07.12.2011	Rektalabstrich	23	männlich	31	CTX-M-1	TEM-1	B1
RS259	REV-1266	09.12.2011	Rektalabstrich	70	männlich	13	CTX-M-1		B2
RS260	REV-1269	10.12.2011	Rektalabstrich	61	männlich	10	CTX-M-1		B1
RS261	REV-1271	22.12.2011	Rektalabstrich	48	weiblich	13	CTX-M-3		B2
RS262	REV-1272	02.01.2012	Rektalabstrich	51	weiblich	12	CTX-M-27		B2
RS263	REV-1274	29.12.2011	Rektalabstrich	33	weiblich	12	CTX-M-1	TEM-1	B2
RS264	REV-1278	03.01.2012	Rektalabstrich	52	männlich	12	CTX-M-1	TEM-1	B2
RS265	REV-1279	02.01.2012	Rektalabstrich	56	männlich	15	CTX-M-1		A

Tabelle A2: CTX-M-8-produzierende Isolate

Studien-ID	Urspr. Isolate-Nr.	$\beta$ -Laktamasen	PLZ- Bereich	Material
<i>E. coli</i> 1	RS52	CTX-M-8 + TEM-1	13	Rektalabstrich
<i>E. coli</i> 2	RS65	CTX-M-8 + TEM-1	13	Rektalabstrich
<i>E. coli</i> 3	RS69	CTX-M-8 + TEM-135	14	Urin
<i>E. coli</i> 4	RS213	CTX-M-8 + TEM-1	15	Urin
<i>E. aerogenes</i>	4/12	CTX-M-8	34	Urin
<i>S. Newport</i>	209/10	CTX-M-8	99	Stuhl
<i>S. Agona</i>	520/12	CTX-M-8	49	Stuhl
<i>S. Anatum</i>	735/12	CTX-M-8		Hackfleisch

XXX



RS275	330.944.796	26.03.2012	Medizinisches Labor Hofheim Main-Taunus	Urin	5	weiblich	65	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	B2
RS276	330.944.796	26.03.2012	Medizinisches Labor Hofheim Main-Taunus	Urin	76	weiblich	65	CTX-M-15	TEM-1	aac(6)1b-cr	B2
RS277	330.943.170	15.03.2012	Medizinisches Labor Hofheim Main-Taunus	Vaginaabstrich	0	weiblich	65	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	B2
RS287	D.17.261.9.7	29.02.2012	MVZ Lehnre	Urin	50	weiblich	30	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	A
RS288	D.17.261.9.8	29.02.2012	MVZ Lehnre	Urin	77	männlich	27	CTX-M-15	TEM-1	aac(6)1b-cr	B1
RS289	O.17.266.2.1	13.03.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Urin	45	weiblich	30	CTX-M-14	TEM-1	aac(6)1b-cr	B2
RS295	O.17.266.2.1	24.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Rachenabstrich	76	männlich	74	CTX-M-14		aac(6)1b-cr	A
RS296	D.17.266.2.2	28.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Nasenabstrich	66	männlich	76	CTX-M-55		aac(6)1b-cr	B2
RS297	D.17.266.2.3	28.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Speichelspeichel	66	männlich	74	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	B2
RS298	D.17.266.2.4	19.03.2012	MVZ L. Göttinger und Kollegen, Ravensburg	Speichelspeichel	59	weiblich	87	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	B2
RS304	U4323	19.03.2012	MVZ L. Göttinger und Kollegen, Ravensburg	Urin	76	weiblich	87	CTX-M-15		aac(6)1b-cr	B2
RS305	U4139	20.03.2012	MVZ Labor Gärtnner und Kollegen, Ravensburg	Urin	76	weiblich	88	CTX-M-27		aac(6)1b-cr	B2
RS306	U4550	21.03.2012	MVZ Labor Gärtnner und Kollegen, Ravensburg	Urin	88	männlich	88	CTX-M-27		aac(6)1b-cr	B2
RS307	U5015	23.03.2012	MVZ Labor Gärtnner und Kollegen, Ravensburg	Urin	50	weiblich	88	CTX-M-55		aac(6)1b-cr	D
RS308	U4729	23.03.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	86	weiblich	72	CTX-M-14	TEM-1	aac(6)1b-cr	B2
RS314	21020195	21.02.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	69	weiblich		CTX-M-14	TEM-1		B2
RS315	21020140	21.02.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	85	weiblich		CTX-M-14	TEM-1		D
RS316	02030316	02.03.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	77	weiblich		CTX-M-14	TEM-1		D
RS317	26030338	26.03.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	31	weiblich		CTX-M-14	TEM-1		D
RS318	26030338	27.03.2012	MVZ Switkowski, Berlin	Urin	83	weiblich		CTX-M-15	TEM-1		B1
RS324	02450500	24.02.2012	MVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Urin	66	männlich		CTX-M-15	TEM-1		B2
RS325	03215091U	21.03.2012	MVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Urin	90	männlich		CTX-M-27			A
RS326	63250020U	22.03.2012	MVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Urin	71	männlich		CTX-M-1			B2
RS327	04175657R	17.04.2012	MVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Zungenabstrich	67	weiblich		CTX-M-15	TEM-1	aac(6)1b-cr + qnrB1	A
RS328	04175113U	17.04.2012	MVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Urin	71	weiblich		CTX-M-15		aac(6)1b-cr	A
RS372	408550	25.03.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	78	weiblich	97	CTX-M-1			B2

Tabelle A4: nosokomiale ESBL-*E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund

Studien-ID	Ursprüngliche Code	Einsender	Datum der Isolation	Krankenhaus-Code	Material	Alter	Geschlecht	PLZ-Bereich	Vorerkrankungen	Antibiotikabehandlung	ESBL-Lacamasen	weitere β-Lacamasen	PMQR	Phylogenet. Gruppe
R5001	MU138 (8142138)	hospital Laborverbund Brandenburg	2019		Urin						CTX-M-1			B2
R5002	MA200 (81420347)	hospital Laborverbund Brandenburg	2020		Abstrich Dauerkatheter			15			CTX-M-2			B2
R5003	MU1087 (12182240)	hospital Laborverbund Brandenburg	2020		Urin			16			CTX-M-1	TEM-1	aac(6)Ib-cr + qnrS1	A
R5004	MU1115 (81420049)	hospital Laborverbund Brandenburg	2020		Urin			15			CTX-M-15			B2
R5005	MU1133 (81421067)	hospital Laborverbund Brandenburg	2020		Trachealsekret	73	männlich	72	3d vorher Rückenabsztrich neg.		CTX-M-15			B2
R5014		Universitätsklinikum Tübingen	11.01.2020		Bildkultur	15	männlich	72	11d vorher Blutkultur negativ, akute myelische Leukämie		CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	A
R5015	1023	Universitätsklinikum Tübingen	23.08.2020		Urin	94	weiblich	72	4d vorher Urin negativ		CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	B2
R5017	1058	Universitätsklinikum Tübingen	08.10.2020		Bildkultur	52	weiblich	72	3d vorher Blutkultur positiv mit E.coli ohne ESBL		CTX-M-15	TEM-1		B2
R5018	1131	Universitätsklinikum Tübingen	10.01.2021		Urin	72	männlich	73			CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	A
R5020	18752032	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart	12.04.2021		Urethraabstrich	81	weiblich	70			CTX-M-15	TEM-1		B1
R5021	18754094	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart	15.04.2021		Urethraabstrich	70	weiblich	70			CTX-M-15	TEM-1		B1
R5022	18754094	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart	15.04.2021		Urethraabstrich	70	weiblich	70			CTX-M-15	TEM-1		B2
R5023	18900774	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart	20.04.2021		Urin	87	weiblich	70			CTX-M-1	TEM-1		A
R5024	18901048	Labor Prof. G. Enders und Partner, Stuttgart	27.04.2021		Urin	81	weiblich	70			CTX-M-1	TEM-1		A
R5067	M56229 (81412082)	hospital Laborverbund Brandenburg	2011		Stuhl			41			CTX-M-15			D
R5068	MA2941 (12620155)	hospital Laborverbund Brandenburg	2011		Abstrich	13					CTX-M-1	TEM-1		D
R5072	8318793	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Urin	81	weiblich	99			CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	B2
R5073	8318793	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Urin	65	weiblich	99			CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	A
R5074	8318793	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Urin	65	männlich	99			CTX-M-15	TEM-1	qnrS1	B2
R5075	8033382	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	06.09.2011		Urin	83	weiblich	99			CTX-M-1	TEM-1		B1
R5076	8519471	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	17.08.2011		Urin	82	weiblich	23			CTX-M-1	TEM-1		A
R5083	130769	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	15.08.2011		Analabstrich	41	männlich	22	Verbreitungsgrundlage		CTX-M-15	TEM-1	aac(6)Ib-cr	B2
R5084	H18484/2	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Leistenabstrich	66	männlich	22	Pat. Neurid. Fröhneha		CTX-M-1	TEM-1		D
R5085	H18876	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Leistenabstrich	66	männlich	22	Sepsis		CTX-M-1	TEM-1		B2
R5086	H18876	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	18.08.2011		Leistenabstrich	66	männlich	20			CTX-M-1	TEM-1		B2
R5087	H19427	Labor Dr. Reising-Ackermann, Leipzig	24.08.2011		Spolium	13	männlich	20			CTX-M-1	TEM-1		B2
R5093	017-2593.4 (0405115)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	07.04.2011	Jo-C3	Bauchabstrich	73	weiblich	54	chron. Nf, rheum. A.	Imipenem	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5094	017-2593.5 (15045054)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.04.2011	MA51UR	Urin	84	weiblich		Zn. Apoplex, HWI	Cefuroxim	CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	A
R5095	017-2593.5 (15045240)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.04.2011	MA51UR	Urin	91	weiblich		Zn. Stauungsneure, Pigall, HWI	Cefuroxim	CTX-M-1	TEM-1	aac(6)Ib-cr	B2
R5096	017-2593.7 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	20.04.2011	MA51UR	Urin	76	weiblich		HWI, kardial dekomp	Zn. Stauungsneure, Pigall, HWI	CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	A
R5104	017-2593.9 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	20.04.2011	VELUKST	Urin	83	männlich	45		Roxepirin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5105	017-2593.8 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	20.04.2011	VELUKST	Urin	79	männlich	45			CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	D
R5106	017-2593.2 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	25.03.2011		Urin	0	männlich				CTX-M-1	TEM-1		B2
R5107	017-2593.1 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	29.03.2011		Urin	75	weiblich	59			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	B2
R5108	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	30.03.2011		Urin	27	weiblich	59			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	A
R5109	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	30.03.2011		Urin	82	weiblich	59			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	B2
R5114	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.05.2011		Urin	36	männlich	39	HWI, Bronchopneumonie		CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	A
R5115	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.05.2011		Urin	36	männlich	39			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	B2
R5116	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.05.2011		Urin	36	männlich	39			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	B2
R5117	017-2593.3 (15045031)	MVZ Labor Evidel und Kollegen, Essen	16.05.2011		Urin	36	männlich	39			CTX-M-1		aac(6)Ib-cr	B2
R5118	016-2534.6 (67041104)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	11.04.2011		Urin	84	weiblich	93			CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5119	016-2534.7 (65811204)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	12.04.2011		Wundabstrich	79	männlich	84	chron. Bronchitis		CTX-M-15	TEM-1		B2
R5120	016-2534.8 (61521104)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	12.04.2011		Stuhl	76	männlich				CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5121	016-2534.9 (64881204)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	11.04.2011		Urin	76	männlich				CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	A
R5122	016-2535.1 (69391304)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	13.04.2011		Leistenabstrich	63	männlich	94	ja		CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	A
R5123	016-2535.1 (69391304)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	13.04.2011		Leistenabstrich	63	männlich	94	nein		CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5124	016-2535.1 (69391304)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	13.04.2011		Leistenabstrich	63	männlich	94	nein		CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5125	016-2535.1 (69391304)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	13.04.2011		Leistenabstrich	63	männlich	94	nein		CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5126	016-2535.1 (69391304)	MVZ Dr. Wigel und Kollegen, Passau	13.04.2011		Leistenabstrich	63	männlich	94	nein		CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5127	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Cefazolin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5128	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Clont/Cefuroxim	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5129	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5130	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Nitrofurantoin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5131	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5132	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5133	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5134	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5135	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5136	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5137	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5138	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5139	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5140	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5141	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5142	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5143	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5144	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5145	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5146	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5147	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5148	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5149	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5150	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5151	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5152	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5153	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5154	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5155	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5156	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5157	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5158	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5159	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5160	017-2593.4 (194-236483)	Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg	18.07.2011	617	Abstrichabstrich, saezal	49	männlich	68	Ja? Helium CA	Amoxicillin	CTX-M-15		aac(6)Ib-cr	B2
R5161	017-2593.4 (194-236483)													

RS274	330.938.883	26.02.2012	Medisches Labor Hofheim Main, Tronax	Wundabstrich	62	männlich	65		CTX-M-55	aac(6)Ib-cr	A
RS278	017.266.2.5	26.02.2012	Medisches Labor Hofheim Main, Tronax	Urin	74	weiblich	66	Harnwegsinfektion	CTX-M-11	aac(6)Ib-cr	B1
RS279	017.266.2.6	28.02.2012	Sankt-Katharinen-Krankenhaus, Frankfurt/Main	Urin	79	weiblich	60	Harnwegsinfektion	CTX-M-1		B2
RS280	017.266.2.7	02.02.2012	Sankt-Katharinen-Krankenhaus, Frankfurt/Main	Urin	81	männlich	60	Harnwegsinfektion	CTX-M-15	TEM-1	B2
RS281	017.266.2.8	04.02.2012	Sankt-Katharinen-Krankenhaus, Frankfurt/Main	Urin	65	männlich	60	Harnwegsinfektion	CTX-M-15	TEM-1	B2
RS282	017.266.2.9	09.02.2012	Sankt-Katharinen-Krankenhaus, Frankfurt/Main	Urin	74	weiblich	31	Harnwegsinfektion	CTX-M-12		B2
RS283	017.261.9.3	23.02.2012	WVZ Lehnre	Trachealsekret	81	weiblich	31		CTX-M-1	TEM-1	B2
RS284	017.261.9.4	25.02.2012	WVZ Lehnre	Urin	72	männlich	29		CTX-M-15	TEM-1	B2
RS285	017.261.9.5	07.02.2012	WVZ Lehnre	Urin	72	weiblich	38		CTX-M-1	TEM-1	D
RS286	017.261.9.6	22.02.2012	WVZ Lehnre	Wundabstrich	84	weiblich	38		CTX-M-1		D
RS290	017.266.1.5	23.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Wundabstrich	86	weiblich	73	HUFT-TEP	CTX-M-15	aac(6)Ib-cr	B2
RS291	017.266.1.6	23.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	Rachenabstrich	78	weiblich	73	Personale Blutung	CTX-M-3		D
RS292	017.266.1.7	20.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	AnaLabstrich	81	männlich	76	SAB	CTX-M-15		D
RS293	017.266.1.8	20.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	AnaLabstrich	81	männlich	76	Infektionskrankheit	CTX-M-15		D
RS294	017.266.1.9	21.02.2012	Labor Dr. Seelig, Karlsruhe	AnaLabstrich	73	männlich	75	Infektionskrankheit	CTX-M-55	aac(6)Ib-cr	A
RS299	U3733	19.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Urin	78	weiblich	88	Harnwegsinfektion	CTX-M-1	TEM-1	B1
RS300	U3755	19.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Urin	79	männlich	78	Morbus Wegener	TEM-52c		A
RS301	U3760	19.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Urin	74	männlich	88		CTX-M-55	TEM-1	A
RS302	U424	20.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Blutkultur	64	weiblich	73		CTX-M-15	TEM-1	B2
RS303	U3562	28.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Urin	73	männlich	78		HWV-21		B2
RS305	U3562	28.02.2012	WVZ Labor Gärtnere und Kollegen, Ravensburg	Urin	73	männlich	78		CTX-M-15	TEM-1	B2
RS306	26031001	27.02.2012	WVZ Switkowski, Berlin	Urin	91	weiblich	14		CTX-M-1		B1
RS310	26031001	27.02.2012	WVZ Switkowski, Berlin	Urin	91	weiblich	14		CTX-M-1		B1
RS311	24031424	25.02.2012	WVZ Switkowski, Berlin	Urin	87	weiblich	14		CTX-M-1	TEM-1	D
RS312	24031341	24.02.2012	WVZ Switkowski, Berlin	Urin	68	männlich	10		CTX-M-1		D
RS313	2403255/1	25.02.2012	WVZ Switkowski, Berlin	Abdomen	85	männlich	10		CTX-M-1		D
RS319	02451380	23.02.2012	WVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Blutkultur	87	weiblich	97	Magen Karzinom	CTX-M-15	aac(6)Ib-cr	B2
RS320	02451380	23.02.2012	WVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Blutkultur	87	weiblich	97		CTX-M-15	aac(6)Ib-cr	D
RS321	03265148B	26.02.2012	WVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Blutkultur	52	männlich	97		CTX-M-15	aac(6)Ib-cr	B2
RS322	03155111B	15.02.2012	WVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Blutkultur	56	männlich	97		CTX-M-15	TEM-1	D
RS323	03175022A	17.02.2012	WVZ Cornely, Riebe, Berndt, Aachen	Trachealsekret	74	männlich	97		CTX-M-1	TEM-1	A
RS329	2283804	01.02.2012	ELK Resa	Urin	71	weiblich	97		CTX-M-1		A
RS362	408564	31.02.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	AnaLabstrich	66	männlich	97		CTX-M-15	TEM-1	B2
RS363	412480	27.02.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Wundabstrich	71	weiblich	97		CTX-M-15	TEM-1	B2
RS366	412480	11.02.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	AnaLabstrich	82	weiblich	97		CTX-M-1		D
RS367	410341	08.02.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	75	weiblich	97		CTX-M-14	TEM-1	A
RS368	486863	22.02.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	81	weiblich	97		CTX-M-15		B2
RS369	471227	07.08.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	87	weiblich	97		CTX-M-15	TEM-1	A
RS370	411784	15.07.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	86	männlich	97		CTX-M-15		B1
RS371	474680	09.07.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Urin	77	männlich	97		CTX-M-15		A
RS372	508338/11964469	21.12.2012	Zentrallabor Caritas Krankenhaus, Bad Mergentheim	Blutkultur	70	männlich	97		CTX-M-15	TEM-1	A
RS393	507724/11932484	26.10.2012	Carl-Neuberg-Klinikum, Cottbus	Blutkultur	70	weiblich	03	Mitralklappeninfuff., Lungenödem, Diabetes mellitus, COPD	CTX-M-15	aac(6)Ib	B2
RS394	507724/11932484	26.10.2012	Carl-Neuberg-Klinikum, Cottbus	Blutkultur	76	weiblich	03	Harnwegsinfektion	CTX-M-15	TEM-1	D

Tabelle A5: Drittgenrations-Cephalosporin-resistente *S. enterica* aus dem NRZ

Studien-ID	Original-Nummer	Serovar	β-Laktamasen	PMQR	LysoTyp	O Antigen	H1 Antigen	H2 Antigen	Antimikrobielle Resistenzen									
2005	05-07006	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-07005	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-07003	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		OTE	SMZ	
	05-06759	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-06758	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-06757	S. Bareilly	ACC-1			6,7	y	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-06411	S. Typhimurium	CTX-M-14			4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	05-06410	S. Typhimurium	CTX-M-14 + TEM-1			4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		CMP	SMZ SXT	
	05-06146	S. Typhimurium	TEM-52			4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		CMP	SMZ	
	05-05144	S. Corvallis	TEM-52		RDNC	8,20	z4,223	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-05143	S. Enteritidis	CTX-M		21/1	9,12	g,m	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ	
	05-03486	S. Virchow	CTX-M-2		VR PT 37	6,7	r	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		NAL	SMZ SXT	
	05-03238	S. Concord	CTX-M-15 + SHV-12			6,7	lv	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	05-00102	S. Infantis	TEM-52			6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		CMP	SMZ	
	2006	06-08778	S. Typhimurium	SHV-12		DT063	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			SMZ SXT
06-08687		S. Subspecies 1	TEM-52		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ	
06-08618		S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1			4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
06-08556		S. Typhimurium	CTX-M-1						AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		KAN	SMZ SXT	
06-08455		S. Typhimurium	CTX-M-1			4,5,12	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		KAN	SMZ SXT	
06-08367		S. Virchow	SHV-12 + TEM-1		VR PT 30	6,7	r	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
06-08249		S. Typhimurium mono	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		NAL	SMZ SXT	
06-06589		S. Typhimurium	SHV-12		DT063	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
06-04713		S. Agona	SHV-12	qnrB	RDNC	4,12	f,g,s	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
06-01660		S. Subspecies 1	TEM-52						AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
2007		07-07616	S. Virchow	CTX-M-15 + TEM-1		VR PT 31	6,7	r	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT
		07-07606	S. Kentucky	CTX-M-1			8,20	i	x6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ
		07-07367	S. Enteritidis	SHV-2		4/6	9,12	g,m	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ
		07-07330	S. Kentucky	CTX-M-1			8,20	i	x6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ
		07-07318	S. Typhimurium	CTX-M-1		ut	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT
	07-07061	S. Typhimurium	CTX-M-1		ut	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-06724	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-04327	S. Typhimurium	CTX-M-1		ut	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-03191	S. Typhimurium	CTX-M-14		DT120	4,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ	
	07-02328	S. Infantis	CTX-M-1			6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ	
	07-02200	S. Typhimurium	CTX-M-1		DT093	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-02066	S. Typhimurium	CTX-M-1		DT193	4,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01979	S. Typhimurium	CTX-M-1		ut	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01903	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01652	S. Typhimurium mono	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5,12	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01644	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5,12	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01359	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01311	S. Typhimurium	CTX-M-1 + PSE-1 + TEM-1		DT104	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01310	S. Typhimurium	CTX-M-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01259	S. Typhimurium	CTX-M-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01256	S. Typhimurium	CTX-M-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01109	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-01108	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00944	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00943	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00904	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00903	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00902	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00786	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00778	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00777	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00766	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00764	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00763	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	07-00762	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1		DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	
	491/12	07-00947	S. Enteritidis		8/7	9,12	g,m	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		CMP	SMZ SXT	
	75/08	07-00259	S. Paratyphi B	TEM-52	Dundee Var1/nc	4,12	b	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	SMZ SXT	

2008	08-00751	S. Typhimurium	CTX-M-1 + TEM-1	DT10	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	CMP	OTE	SMZ	SXT	
	08-07542	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX				STR	OTE	SMZ	SXT	
	08-07541	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	COX			STR	OTE	SMZ	SXT	
	08-07451	S. Anatum	CMV-2		3,10	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX						SMZ	SXT	
	08-07307	S. Goldcoast	CTX-M-1		6,8	r	1,w	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX						SMZ	SXT	
	08-07203	S. Chester	CTX-M-14		4,12	e,h	e,n,x	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX						SMZ	SXT	
	08-06860	S. Mikawasima	CTX-M-1		6,7	y	e,p,z15	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CIP	SMZ	
	08-06741	S. Kentucky	CTX-M-14		8,20	i	z6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR	NAL	CMP	OTE	
	08-06331	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-06243	S. Kentucky	CTX-M-14		8,20	i	z6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-05388	S. Panama	CTX-M-1		9,12	l,v		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-05401	S. Enteritidis	CTX-M-1	6a/3a	9,12	g,m		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-05073	S. Kentucky	CTX-M-14		8,20	i	z6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-04776	S. Typhi	CTX-M-15 + TEM	E9	9,12	d		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	08-04528	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT208	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR	NAL	CMP	OTE	
	08-04527	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT208	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR	NAL	CMP	OTE	
	08-04512	S. Thomson	CMV-2		6,7	k		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX				SMZ	SXT	
	08-02810	S. Goldcoast	CTX-M-1		6,8	r	l,w	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	08-02499	S. Goldcoast	CTX-M-1		6,8	r	l,w	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	08-02441	S. Subspecies 1	TEM-52						AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT
	08-00094	S. Derby	CTX-M-1	DY PT 49	4,12	f,g		-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR	CMP	OTE	SMZ	SXT
2009	09-08346	S. Infantis	CTX-M-14	IN PT 35	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX						SMZ		
	09-08005	S. Bovismorbificans	CTX-M-14	RONC	6,8	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX						SMZ		
	09-07722	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	STR	NAL	CMP	OTE	
	09-07381	S. Infantis	CTX-M-1	IN PT 004	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	09-07350	S. Livingstone	CTX-M-1		6,7	d	l,w	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	09-07337	S. Infantis	CTX-M-1	RONC	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-07280	S. Infantis	CTX-M-1	RONC	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-07160	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	CMP	OTE	SMZ	SXT	
	09-06452	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-06229	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR	CMP	OTE	SXT		
	09-05885	S. Infantis	CTX-M-1	RONC	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-05705	S. Newport	CTX-M-8		6,8	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-04930	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	COX			STR	CMP	OTE	SMZ	
	09-04640	S. Infantis	CTX-M-1	IN PT 001	6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX			STR		SMZ	SXT		
	09-04422	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT001	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX				SMZ		
	09-03449-1	S. Corvallis	CMV-2		8,20	z4,23		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX		NAL		SMZ		
	09-03449-2	S. Senftenberg	CMV-2		3,19	g,s,t		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	STR		SMZ		
	09-03271	S. Rissen	CTX-M-1		6,7	f,g		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX		STR	CMP	OTE	SMZ	
	09-01833	S. Goldcoast	CTX-M-1		6,8	r	l,w	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	09-01366	S. Kapemba	CTX-M-1		9,12	l,v		1,7	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT	
	09-00674	S. Infantis	CTX-M-1		6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
	09-00050	S. Enteritidis	CTX-M-3	IN PT 001	9,12	g,m		-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT	
	09-00009	S. Kapemba	CTX-M-1	4/6	9,12	l,v	1,7	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ			STR		SMZ	SXT	
2010	10-06700	S. Rissen	SHV-12 + TEM-1	IN PT 001	6,7	f,g		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	CMP	OTE	SMZ	SXT	
	10-06657	S.e. Infantis	CTX-M-1		6,7	r	1,5	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR		SMZ	SXT		
	10-05636	S. Senftenberg	CTX-M-1		3,19	g,s,t		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-05475	S. Anatum	CTX-M-1		3,10	e,h	1,6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	NAL	CIP	SMZ	SXT	
	10-05104	S. Kentucky	CTX-M-9		8,20	i	z6	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	NAL	CIP	SMZ	SXT	
	10-05062	S. Enteritidis	CTX-M-1	3/1	9,12	g,m		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	NAL	CMP	OTE	SMZ	
	10-04951	S. Typhimurium	CTX-M-14	DT104	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR	NAL	CMP	OTE	SMZ	
	10-03309	S. Derby	CTX-M-1	DY PT 08	4,12	f,g		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	NAL	CMP	OTE	SMZ	
	10-02701	S. Typhimurium	SHV-12	DT120	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	NAL	CMP	OTE	SMZ	
	10-02700	S. Typhimurium	SHV-12	DT120	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	GEN	STR	NAL	CMP	OTE	SMZ	
	10-02603	S. Typhimurium	CTX-M-14	DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-02352	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT120	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-02338	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT001	4,5,12	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-02243	S. Typhimurium	CTX-M-14	DT193	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-02043	S. Typhimurium	CTX-M-1	PTJ311	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-01926	S. Typhimurium	CTX-M-1	PTJ311	4,5	i	1,2	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	KAN	STR	NAL	CIP	SMZ	SXT	
	10-01020	S. Enteritidis	CTX-M-1	4/6	9,12	g,m		AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-00884	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		
	10-00566	S. Typhimurium	CTX-M-1	DT193	4,5	i	-	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ		STR		SMZ	SXT		

213/10	10-00546	S. Havana	CTX-M-1	13.23	f <sub>lg</sub>	-	AMP	MEZ	MSU	CTX	CAZ	COX	GEN	STR	CMP	OTE	SMZ	SXT
488/12	10-06096	S. Typhimurium	TEM-1 + CMY-2	4.5	i	-	AMP	MEZ	CTM	CTX	CAZ	COX						
33/10	9542221/D373823	S. Abony	CTX-M-1				AMP	MEZ	CTM	CTX	CAZ						SMZ	
2011																		
25/12	11-09247	Salmonella Subspez.	CTX-M-1	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ							
26/12	11-09131	S. Typhimurium	CTX-M-1	6.8	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		OTE		
27/12	11-08891	S. Newport	CTX-M-15	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ							
28/12	11-08480	S. Typhimurium	CTX-M-1	13.22	z		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		OTE	SMZ	SXT
29/12	11-08148	S. Poona	CTX-M-1	3.10	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR			SMZ	SXT
30/12	11-07983	S. Anatum	CTX-M-1	3.10	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ				NAL			
31/12	11-07899	S. Anatum	CTX-M-1	4	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR			SMZ	SXT
32/12	11-07764	S. Typhimurium	CTX-M-1	6.8	r		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		OTE		
33/12	11-07271	S. Goldcoast	CMY-2	4.5	i		AMP	MEZ	CTM	CAZ		COX		STR			SMZ	
35/12	11-06934	S. Typhimurium	TEM-1 + SHV	4.5	i		AMP	MEZ	CTM	CAZ			GEN	STR		OTE	SMZ	SXT
36/12	11-06857	S. Typhimurium	TEM-1 + SHV	4.5	i		AMP	MEZ	CTM	CAZ			GEN	STR		OTE	SMZ	SXT
38/12	11-06213	S. Typhimurium	CTX-M-1	4.12	i		AMP	MEZ	CTM	CAZ			GEN	STR			SMZ	SXT
39/12	11-06084	S. Virchow	SHV-12	6.7	r		AMP	MEZ	CTM	CAZ				STR		OTE	SMZ	SXT
40/12	11-05705	S. Typhimurium	TEM-1 + CTX-M-9	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
41/12	11-03520	S. Typhimurium	TEM-1 + CTX-M-9	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
42/12	11-01928	S. Kedougou	CMY-2	13.23	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
43/12	11-01362	S. Havana	CTX-M-15	13.23	f <sub>lg</sub>		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
44/12	11-00965	S. Typhimurium	TEM-1 + CTX-M-9	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
45/12	11-00763	S. Infantis	CTX-M-1	6.7	r		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR		CMP	CIP	SMZ
46/12	11-00732	S. Typhimurium	TEM-1 + CTX-M-1	4.5	i		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR			SMZ	SXT
47/12	11-00619	S. Putten	CTX-M-1	13.23	d		AMP	MEZ	CTM	CAZ				STR		OTE		
49/12	11-00115	S. Anatum	CTX-M-1	3.10	e,h		AMP	MEZ	MSU	CTM	CAZ			STR			SMZ	SXT
489/12	11-07010	S. Typhimurium mono	TEM-52	4.5	i		AMP	MEZ	CTM	CAZ			GEN	STR		OTE		
veterinär																		
76/08	07-00432	Paratyphi B	TEM-52															
77/08	07-03181	Paratyphi B	CMY-2															
78/08	07-06483	Paratyphi B	TEM-52															
415/08	07-4515-1	Paratyphi	TEM-52															

Dundee Var1/nc

## Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

Tabelle A6: MHK der ambulanten ESBL-*E. coli* aus dem Charité Universitätsklinikum Berlin

Studien-ID	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	SMZ	SXT	IPM	FEP	ETP
RS031	>16	>32	4	4	>16	≤2	2-16	1	>32	32	16	>32	8	>8	>64	>512	>128	27	22	37
RS032	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	>32	>32	≤4	1	>64	>512	>128	27	11	29
RS033	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	4	8	8	64	8	>32	>8	≤0,063	>512	>128	24	0	31
RS034	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	≤0,5	16	4	16	>32	>32	>8	>64	>512	>128	27	15	30
RS038	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	4	4	64	>32	16	>8	32	>512	>128	30	17	24
RS039	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	1	4	8	8	≤4	8	>8	≤0,063	>512	8	27	17	24
RS040	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	16	≤2	>64	>32	8	1	>64	>512	16	27	14	23
RS041	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	8	4	32	>32	8	>8	16	>512	>128	28	5	23
RS042	>16	>32	32	>8	16	>32	2-16	1	4	4	>64	>32	>32	>8	32	>512	>128	28	23	26
RS043	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	≤2	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	24	5	21
RS044	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	32	4	>64	>32	8	>8	0,25	>512	>128	25	12	24
RS045	>16	>32	≤2	>8	>16	4	2-16	1	4	8	>64	>32	8	>8	32	>512	>128	29	21	26
RS046	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	4	8	>32	16	>8	0,25	>512	8	26	18	25
RS047	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	≤2	8	8	8	4	≤0,063	>512	>128	25	18	25
RS048	>16	>32	8	>8	>16	4	2-16	1	4	4	64	8	8	>8	≤0,063	>512	>128	28	17	23
RS049	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	≤0,5	8	4	32	>32	≤4	2	32	>512	>128	26	17	23
RS050	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	16	>32	8	2	>64	>512	>128	29	15	25
RS051	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	≤0,5	4	4	≤4	8	8	1	≤0,063	>512	≤4	28	18	21
RS053	>16	>32	32	>8	>16	16	2-16	≤0,5	8	4	16	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	24	13	23
RS054	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	≤0,5	8	4	32	>32	8	2	32	>512	>128	24	12	23
RS055	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	16	16	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	25	12	20
RS056	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	16	4(16)	8	>32	8	>8	0,5	>512	≤4	28	18	26
RS057	>16	>32	≤2	>8	>16	≤2	2-16	1	4	4	≤4	≤4	≤4	>8	≤0,063	>512	≤4	30	22	27
RS058	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	>32	16	>64	>32	8	1	1	>512	>128	23	19	26
RS059	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	4	≤4	>32	8	>8	32	>512	≤4	30	26	24
RS060	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	1	16	8	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	29	22	27
RS061	>16	>32	32	>8	>16	8	2	>8	16	≤2	>64	>32	>32	>8	16	>512	>128	28	20	29
RS062	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	≤0,5	4	≤2	>64	>32	8	>8	32	>512	>128	26	14	26
RS063	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	32	>64	>32	8	1	1	>512	>128	27	18	28
RS064	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	2	>32	4	32	>32	>32	>8	64	>512	>128	30	18	26
RS207	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	4	≤2	32	>32	>32	>8	16	>512	>128	25	21	30
RS208	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	>8	32	4	>64	>32	16	>8	0,25	>512	>128	23	24	31
RS209	>16	>32	≤2	1	16	4	2-16	1	16	8	>64	>32	8	2	0,5	>512	≤4	28	32	35
RS210	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	25	20	30
RS211	>16	>32	4	>8	>16	4	2-16	1	4	4	>64	≤4	16	2	≤0,063	>512	>128	26	23	32
RS212	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	8	≤2	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	26	21	31
RS213	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	2	8	≤2	>64	>32	>32	>8	16	>512	>128	33	24	33
RS214	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	>8	4	≤2	32	>32	8	>8	0,5	>512	≤4	26	16	30
RS215	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	8	≤2	>64	>32	8	>8	16	>512	>128	27	24	30
RS216	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	4	≤2	8	≤4	8	1	≤0,063	>512	≤4	28	23	33
RS217	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	4	4	>64	≤4	>32	>8	≤0,063	>512	>128	25	18	32
RS218	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	8	≤2	16	>32	8	>8	32	>512	>128	26	18	31
RS219	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	1	4	≤2	>64	≤4	>32	1	≤0,063	>512	>128	26	17	29
RS220	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	>64	>32	8	1	>64	>512	>128	25	18	30
RS222	>16	>32	≤2	>8	>16	≤2	2-16	4	>32	≤2	64	>32	>32	>8	1	>512	>128	24	25	33
RS223	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	64	>32	8	>8	>64	>512	>128	28	16	31
RS224	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	4	16	≤2	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	25	20	32
RS225	>16	>32	16	>8	>16	8	2-16	1	4	≤2	32	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	23	22	33
RS226	>16	>32	≤2	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	8	≤2	8	≤4	≤4	>8	≤0,063	>512	>128	40	25	40
RS227	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	1	4	≤2	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	27	28	36
RS228	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	>8	>32	16	>64	>32	>32	>8	32	>512	>128	32	27	35
RS229	>16	>32	>32	>8	>16	4	2	≤0,5	4	≤2	16	8	32	>8	≤0,063	>512	>128	24	27	34
RS233	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	4	32	>32	8	>8	>64	>512	>128	31	15	31
RS234	>16	>32	16	>8	>16	4	2-16	1	8	4	8	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	30	17	30
RS235	>16	>32	32	>8	>16	4	2-16	≤0,5	4	≤2	>64	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	28	18	28
RS236	>16	>32	16	>8	>16	4	2-16	1	>32	16	32	>32	8	>8	>64	>512	>128	29	22	30
RS237	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	30	11	28
RS238	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	16	>32	8	4	>64	>512	>128	27	14	26
RS239	>16	>32	>32	>8	>16	8	32	>8	16	≤2	32	>32	8	>8	>64	>512	>128	29	17	27
RS240	>16	>32	4	>8	>16	16	2-16	1	16	4	8	>32	8	2	32	>512	≤4	25	18	30
RS241	>16	>32	≤2	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	>64	>32	16	>8	0,25	>512	>128	26	14	26

## Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

RS242	>16	>32		>8	>16	8	2-16	4	8	16	16	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	28	17	28
RS243	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	2	16	4	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	25	11	26
RS244	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	4	8	4	16	>32	8	8	32	>512	≤4	27	20	30
RS245	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	1	16	≤2	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	28	15	28
RS246	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	2	4	4	>64	8	8	>8	≤0,063	>512	>128	24	18	26
RS247	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	8	≤2	8	>32	8	2	64	>512	≤4	29	10	28
RS248	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	16	8	8	>32	8	4	0,25	>512	≤4	25	18	29
RS249	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	≤0,5	8	4	8	>32	8	4	0,5	>512	≤4	23	15	23
RS250	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	2	4	≤2	>64	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	28	19	28
RS252	>16	>32	≤2	>8	>16	4	2-16	1	16	16	64	>32	8	1	64	>512	>128	29	28	32
RS253	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	1	4	4	8	>32	8	2	16	>512	8	26	25	27
RS254	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	16	>32	16	>8	>64	>512	>128	28	15	27
RS255	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	≤0,5	4	4	>64	>32	>32	>8	64	>512	>128	28	18	29
RS256	>16	>32	8	>8	>16	4	2-16	≤0,5	8	≤2	32	8	8	2	≤0,063	>512	>128	28	19	31
RS257	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	2	>32	8	8	>32	16	>8	≤0,063	>512	≤4	32	11	30
RS258	>16	>32	16	>8	>16	≤2	2	≤0,5	4	≤2	16	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	32	17	31
RS259	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	4	8	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	30	15	30
RS260	>16	>32	8	>8	>16	8	2-16	2	8	8	>64	≤4	16	8	≤0,063	>512	>128	35	25	34
RS261	>16	>32	4	>8	>16	4	2-16	2	16	16	64	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	32	18	33
RS262	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	2	8	4	>64	>32	8	>8	32	>512	>128	26	19	31
RS263	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	32	16	16	32	8	4	0,5	>512	≤4	22	5	25
RS264	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	32	8	>64	>32	8	>8	0,5	>512	>128	24	15	29
RS265	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	2	16	8	>64	≤4	8	4	≤0,063	>512	>128	26	5	25



# Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

**Tabelle A7: MHK der ambulanten ESBL-*E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund**

Studien-ID	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	SMZ	SXT	IPM	FEP	ETP
RS007	>16	>32	32	>8	>16	4	2-16	1	4	8	>64	16	≤4	2	≤0,063	>512	>128	25	14	28
RS008	>16	>32	32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	8	≤2	>64	8	8	>8	≤0,063	>512	>128	26	16	28
RS010	>16	>32	32	>8	>16	≤2	2-16	2	>32	≤2	>64	16	8	8	≤0,063	>512	>128	24	10	27
RS 011	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	2	4	≤2	32	>32	≤4	>8	0,5	>512	>128	22	5	25
RS012	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	16	>32	>32	>8	>64	>512	>128	25	12	24
RS013	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	32	16	>32	8	>8	>64	>512	>128	25	13	31
RS025	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	1	>32	32	>64	>32	≤4	1	>64	>512	>128	24	14	35
RS026	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	1	4	4	8	>32	≤4	>8	64	>512	>128	25	20	40
RS027	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	≤2	≤4	>32	8	>8	64	>512	≤4	25	14	33
RS028	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	>8	8	8	>32	8	8	≤1	64	>512	≤4	24	5	32
RS029	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	2	>32	16	64	>32	8	4	>64	>512	>128	28	23	37
RS069	>16	>32	4	>8	16	≤2	2-16	≤0,5	4	4	8	>32	8	>8	16	>512	≤4	28	17	28
RS070	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	1	8	≤2	≤4	>32	8	4	16	>512	≤4	29	20	28
RS071	>16	>32	≤2	>8	16	≤2	2-16	1	>32	32	16	>32	8	>8	>64	>512	>128	30	23	29
RS077	>16	>32	≤2	>8	>16	4	2-16	2	8	8	32	≤4	8	1	≤0,063	>512	>128	30	19	30
RS078	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	1	4	≤2	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	27	17	28
RS079	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	32	>32	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	28	15	27
RS080	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	16	>32	8	>8	>64	>512	>128	28	13	29
RS081	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	>32	≤2	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	27	13	26
RS082	>16	>32	>32	>8	>16	8	32	≤0,5	>32	≤2	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	30	15	26
RS088	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	4	4	8	>32	≤4	1	32	>512	≤4	27	15	24
RS089	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	8	>32	4	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	26	15	25
RS090	>16	>32	8	4	16	8	2-16	4	>32	16	64	>32	8	1	>64	>512	>128	28	22	28
RS091	>16	>32	≤2	>8	8	16	2-16	4	16	4	64	32	8	>8	0,25	>512	>128	27	24	30
RS092	>16	>32	8	>8	>16	8	2-16	>8	>32	4	>64	>32	≤4	1	64	>512	>128	25	18	24
RS099	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	8	>32	32	2	>64	>512	>128	26	14	25
RS100	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	>8	16	4	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	30	22	29
RS101	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	27	14	25
RS102	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	1	>32	8	16	>32	8	1	>64	>512	≤4	29	5	27
RS103	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	>8	>32	8	64	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	26	14	25
RS109	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	>32	≤2	>64	>32	>32	>8	64	>512	>128	28	20	30
RS110	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	1	≤2	4	≤4	>32	≤4	>8	16	>512	≤4	26	0	27
RS111	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	1	>32	16	8	>32	≤4	1	>64	>512	≤4	30	15	30
RS112	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	8	4	>64	>32	16	>8	0,5	>512	>128	30	17	26
RS113	>16	>32	4	>8	>16	32	2-16	1	8	≤2	16	>32	8	>8	64	>512	>128	18	15	28
RS115	>16	>32	16	>8	>16	8	2-16	1	>32	8	32	>32	8	>8	>64	>512	>128	27	23	28
RS116	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	32	>32	8	>8	>64	>512	>128	27	15	26
RS124	>16	>32	>32	>8	>16	16	32	1	16	≤2	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	28	5	23
RS125	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	≤2	>64	>32	8	>8	8	>512	>128	34	23	35
RS126	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	28	5	26
RS127	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	2	>32	8	8	>32	8	1	>64	>512	>128	31	14	30
RS129	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	≤0,5	4	4	64	>32	16	4	>64	>512	>128	30	0	26
RS130	>16	>32	16	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	≤2	64	8	8	≤0,5	≤0,063	>512	>128	30	14	30
RS136	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	≤2	>64	>32	>32	>8	32	>512	>128	30	5	30
RS137	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	16	>32	16	2	2	>512	≤4	30	5	29
RS138	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	>8	8	≤2	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	28	17	29
RS139	>16	>32	4	>8	>16	>32	2-16	1	4	4	8	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	26	28	27
RS140	>16	>32	32	>8	16	>32	2-16	1	4	≤2	32	≤4	>32	>8	≤0,063	>512	≤4	28	28	30
RS143	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	4	8	4	8	>32	16	>8	64	>512	≤4	31	15	29
RS144	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	8	>32	16	8	>64	>512	>128	30	15	30
RS145	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	2	>32	16	16	16	>32	>8	>64	>512	>128	30	15	27
RS146	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	8	4	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	30	20	30
RS157	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	8	8	>64	>32	8	2	32	>512	≤4	30	20	30
RS158	>16	>32	4	>8	>16	>32	2-16	>8	32	8	16	>32	16	8	64	>512	≤4	30	13	27
RS159	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	>8	>32	8	8	>32	8	1	>64	>512	≤4	30	14	30
RS160	>16	>32	4	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	>32	>8	>64	>512	≤4	25	22	31
RS161	>16	>32	16	>8	>16	≤2	2-16	2	8	4	16	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	26	5	28
RS162	>16	>32	4	>8	>16	32	2-16	>8	>32	16	16	>32	8	>8	64	>512	>128	28	5	30
RS163	>16	>32	4	>8	>16	>32	2-16	4	8	≤2	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	30	5	28
RS164	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	8	8	8	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	25	23	28
RS170	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	1	4	≤2	8	>32	16	>8	64	>512	≤4	30	15	29
RS171	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	>8	>32	≤2	>64	>32	16	>8	64	>512	>128	28	25	29

## Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

RS172	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	1	>32	16	64	>32	8	>8	>64	>512	>128	30	27	33
RS173	>16	>32	4	8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	≤2	8	≤4	8	1	≤0,063	>512	≤4	32	25	33
RS174	>16	>32	≤2	>8	4	32	2-16	≤0,5	≤2	≤2	≤4	≤4	8	1	≤0,063	>512	≤4	29	35	31
RS180	>16	>32	4	8	16	8	2-16	2	>32	8	32	>32	8	2	>64	>512	>128	30	27	33
RS181	>16	>32	4	>8	>16	32	2-16	≤0,5	≤2	≤2	8	>32	8	2	64	>512	≤4	30	21	32
RS182	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	1	8	≤2	64	>32	8	>8	32	>512	>128	30	24	33
RS183	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	4	>64	>32	8	>8	32	>512	>128	32	25	35
RS184	>16	>32	4	>8	>16	>32	2-16	1	8	4	64	>32	8	2	0,25	>512	>128	30	20	30
RS185	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	1	>32	8	8	>32	16	>8	>64	>512	≤4	30	20	34
RS191	>16	>32	32	>8	>16	4	2-16	2	≤2	≤2	8	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	31	21	34
RS192	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	8	4	>64	>32	>32	>8	0,65	>512	>128	28	21	30
RS193	>16	>32	16	>8	>16	4	2-16	1	8	≤2	>64	8	8	>8	≤0,063	>512	≤4	31	23	34
RS201	>16	>32	>32	>8	>16	>32	>32	4	>32	8	>64	>32	32	8	>64	>512	>128	33	15	28
RS202	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	2	>32	4	>64	>32	32	>8	>64	>512	16	32	16	26
RS203	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	≤2	8	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	25	19	30
RS204	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	4	>32	8	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	28	24	32
RS205	>16	>32	>32	>8	>16	>32	32	1	32	16	64	>32	16	4	>64	>512	>128	28	14	29
RS275	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	>32	8	8	>32	≤4	>8	>64	>512	≤4	28	17	29
RS276	>16	>32	32	>8	>16	8	2-16	>8	>32	8	>64	>32	>32	2	>64	>512	>128	29	20	30
RS277	>16	>32	8	>8	>16	>32	>32	>8	>32	>16	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	26	20	30
RS287	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	4	≤2	16	≤4	16	2	≤0,063	>512	≤4	28	21	31
RS288	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2	>8	>32	4	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	30	14	27
RS289	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	2	4	4	>64	>32	8	1	32	>512	>128	31	22	32
RS295	>16	>32	32	>8	>16	≤2	2-16	>8	32	4	>64	8	8	>8	≤0,063	>512	≤4	34	31	34
RS296	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	≤4	>32	8	>8	>64	>512	≤4	34	19	34
RS297	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	36	23	33
RS298	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	8	>32	8	>8	>64	>512	≤4	34	21	32
RS304	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	>32	≤2	64	>32	>32	>8	64	>512	>128	22	5	24
RS305	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	1	8	4	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	29	11	29
RS306	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	8	≤2	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	28	12	28
RS307	>16	>32	>32	>8	>16	16	>32	>8	>32	>32	64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	25	6	26
RS308	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	64	>32	≤4	>8	64	>512	>128	28	5	25
RS314	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	>32	≤2	>64	≤4	8	1	≤0,063	>512	≤4	27	11	22
RS315	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	2	16	8	16	>32	>32	>8	0,125	>512	≤4	27	13	27
RS316	>16	>32	32	>8	>16	≤2	2-16	>8	16	4	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	29	10	23
RS317	>16	>32	4	>8	>16	32	32	>8	>32	8	>64	>32	>32	>8	64	>512	>128	26	5	25
RS318	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	≤2	16	>32	8	>8	0,25	>512	>128	25	11	25
RS324	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	≤0,5	8	≤2	64	>32	>32	>8	64	>512	≤4	30	16	28
RS325	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	8	>64	>32	≤4	>8	64	>512	>128	31	22	30
RS326	>16	>32	4	>8	>16	4	32	8	4	≤2	8	>32	>32	4	64	>512	>128	30	26	28
RS327	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	>8	>32	4	>64	8	>32	>8	2	>512	>128	30	22	33
RS328	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	≤0,5	>32	4	8	>32	8	>8	>64	>512	>128	33	21	33
RS372	>16	>32	≤2	8	8	≤2	2-16	1	4	4	8	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	31	33	34

## Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

**Tabelle A8: MHK der nosokomialen ESBL-*E. coli* aus dem Limbach-Laborverbund**

Studien-ID	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	SMZ	SXT	IPM	FEP	ETP
RS001	>16	>32	8	>8	>16	4	2-16	≤0,5	4	4	8	>32	8	2	8	>512	≤4	28	15	30
RS002	>16	>32	8	>8	>16	4	2-16	1	16	4	8	>32	8	>8	0,5	>512	≤4	24	13	27
RS003	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	>32	4	32	16	8	>8	≤0,063	>512	≤4	25	13	29
RS004	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	16	≤2	>64	16	8	4	0,5	>512	>128	26	6	29
RS005	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	1	8	8	32	>32	8	>8	64	>512	>128	27	15	26
RS014	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	1	≤2	4	32	>32	8	1	64	>512	>128	27	25	31
RS015	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	16	>32	8	>8	0,5	>512	>128	28	13	29
RS016	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	>32	8	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	26	12	30
RS017	>16	>32	≤2	>8	>16	≤2	2	≤0,5	8	≤2	8	>32	≤4	4	32	>512	≤4	28	20	29
RS018	>16	>32	8	2	≤1	32	32	≤0,5	4	4	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	30	18	29
RS020	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	>32	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	23	8	26
RS021	>16	>32	32	>8	16	32	2-16	1	4	4	>64	>32	>32	>8	16	>512	>128	26	22	28
RS022	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	16	16	>64	>32	8	>8	32	>512	>128	23	5	28
RS023	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	1	>32	4	8	>32	8	8	32	>512	8	26	11	28
RS024	>16	>32	≤2	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	4	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	27	17	27
RS067	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	4	4	32	16	8	4	≤0,063	>512	≤4	26	6	25
RS068	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	1	>32	≤2	>64	>32	>32	>8	16	>512	≤4	30	8	24
RS072	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	2	>32	8	16	>32	8	1	>64	>512	>128	27	13	27
RS073	>16	>32	32	>8	>16	4	2-16	2	32	≤2	32	8	16	>8	≤0,063	>512	>128	29	20	28
RS074	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	2	>32	8	16	>32	16	>8	>64	>512	>128	27	17	29
RS075	>16	>32	>32	>8	>16	4	>32	≤0,5	4	4	8	32	16	8	16	>512	≤4	21	20	27
RS076	>16	>32	>32	>8	>16	8	2	≤0,5	>32	≤2	>64	≤4	≤4	1	0,125	>512	>128	24	15	24
RS083	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	≤2	8	≤4	≤4	1	≤0,063	≤32	≤4	26	20	25
RS084	>16	>32	8	>8	>16	16	2	>8	>32	8	≤4	≤4	≤4	>8	≤0,063	>512	>128	25	19	25
RS085	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	>8	8	≤2	>64	>32	>32	>8	16	>512	>128	30	17	27
RS086	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	1	>32	≤2	32	>32	32	>8	64	>512	>128	30	19	28
RS087	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	4	≤2	≤4	8	8	1	≤0,063	>512	≤4	27	14	26
RS093	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	>8	>32	18	8	>32	8	>8	>64	>512	≤4	30	17	27
RS094	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	16	8	32	>32	≤4	1	64	>512	>128	28	14	23
RS095	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	>32	≤2	64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	30	21	30
RS096	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	1	4	≤2	>64	>32	8	>8	16	>512	>128	27	16	25
RS097	>16	>32	4	>8	>16	32	2-16	2	8	8	16	>32	8	>8	>64	>512	>128	21	14	25
RS104	>16	>32	8	>8	>16	8	32	1	8	4	32	>32	32	>8	>64	>512	>128	28	23	27
RS105	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	2	8	≤2	16	8	>32	>8	≤0,063	>512	≤4	31	19	29
RS106	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	1	8	4	16	>32	8	1	64	>512	≤4	28	5	26
RS107	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	>8	>32	4	16	>32	8	>8	64	>512	>128	30	18	30
RS108	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	>8	8	≤2	32	>32	8	>8	64	>512	>128	25	18	26
RS114	>16	>32	8	>8	>16	16	2-16	>8	>32	4	16	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	30	18	28
RS117	>16	>32	4	>8	>16	≤2	2-16	2	4	≤2	>64	≤4	8	4	≤0,063	>512	>128	25	18	27
RS118	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	≤2	≤2	32	8	>32	2	≤0,063	>512	>128	27	15	27
RS119	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	>32	>8	64	>512	>128	26	19	27
RS120	>16	>32	4	>8	>16	32	2-16	1	32	4	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	25	16	28
RS121	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	4	≤2	8	>32	≤4	>8	64	>512	≤4	28	13	26
RS122	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	2	>32	8	8	>32	8	>8	64	>512	≤4	27	14	26
RS123	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	1	8	4	>64	>32	16	>8	64	>512	>128	26	19	29
RS132	>16	>32	32	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	≤2	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	27	24	32
RS133	>16	>32	≤2	2	>16	16	2-16	1	4	≤2	>64	>32	8	2	16	>512	>128	27	23	28
RS134	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	8	8	>32	8	1	32	>512	≤4	28	14	30
RS135	>16	>32	4	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	4	16	>32	16	>8	64	>512	>128	27	17	30
RS141	>16	32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	≤2	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	27	15	24
RS142	>16	>32	16	>8	>16	4	32	≤0,5	≤2	≤2	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	30	15	29
RS147	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	>64	>32	8	1	>64	>512	>128	30	5	28
RS148	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	8	16	≤2	>64	16	8	>8	0,5	>512	>128	30	19	29
RS149	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	8	>32	16	>8	>64	>512	>128	27	5	26
RS150	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	4	>32	16	8	>32	8	>8	>64	>512	≤4	30	5	27
RS151	>16	>32	>32	>8	>16	>32	>32	>8	>32	8	>64	>32	32	>8	>64	>512	≤4	24	5	27
RS152	>16	>32	>32	>8	>16	2	2-16	1	4	≤2	32	>32	8	4	32	>512	>128	29	16	29
RS153	>16	>32	4	>8	>16	16	2-16	>8	16	≤2	64	>32	16	>8	>64	>512	>128	25	5	27
RS154	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	8	>32	8	1	>64	>512	≤4	27	5	26
RS155	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	>32	4	>64	≤4	8	4	≤0,063	>512	>128	25	5	26
RS156	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	32	64	>32	16	>8	>64	>512	>128	21	5	23
RS165	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	1	4	≤2	>64	8	8	1	≤0,063	>512	≤4	28	19	28

## Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

RS166	>16	>32	8	>8	>16	8	2-16	1	4	8	16	≤4	8	2	≤0,063	>512	>128	28	15	30
RS167	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	1	4	≤2	8	>32	8	>8	0,25	>512	>128	23	12	26
RS168	>16	>32	32	>8	>16	4	2-16	1	8	4	64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	30	5	29
RS169	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	1	8	4	32	8	>32	2	≤0,063	>512	>128	28	14	27
RS175	>16	>32	32	>8	>16	≤2	2-16	2	32	8	>64	>32	≤4	1	16	>512	>128	35	29	34
RS176	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	4	≤2	8	>32	>16	2	64	>512	≤4	30	16	30
RS177	>16	>32	≤2	>8	16	>32	2-16	≤0,5	4	4	8	>32	8	2	4	>512	≤4	30	28	32
RS178	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	4	2	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	27	22	30
RS179	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	16	>32	8	>8	>64	>512	≤4	30	16	30
RS186	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	28	18	30
RS187	>16	>32	16	>8	>16	4	2-16	1	>32	8	32	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	30	28	35
RS188	>16	>32	4	>8	>16	4	2-16	≤0,5	8	≤2	64	≤4	8	1	0,25	>512	≤4	30	21	30
RS189	>16	>32	≤2	>8	>16	16	2-16	>8	8	≤2	16	>32	8	>8	64	>512	>128	29	23	30
RS190	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	8	4	8	>32	8	>8	>64	>512	>128	31	5	28
RS196	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	16	>32	≤4	2	64	>512	≤4	26	13	30
RS197	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	8	>64	>32	8	>8	>64	>512	>128	32	20	30
RS198	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	32	4	32	≤4	8	>8	≤0,063	>512	>128	32	22	33
RS199	>16	>32	8	>8	>16	4	2-16	1	8	≤2	16	≤4	8	2	≤0,063	>512	≤4	33	22	32
RS200	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	8	4	>64	32	8	>8	1	>512	>128	32	22	31
RS271	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	32	>32	>32	>8	>64	>512	>128	32	22	32
RS272	>16	>32	8	>8	>16	16	2-16	2	>32	16	≤4	>32	16	>8	>64	>512	≤4	28	18	28
RS273	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	2	>32	16	32	>32	16	4	>64	>512	>128	28	26	32
RS274	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	1	>32	4	64	>32	16	8	>64	>512	>128	28	15	29
RS278	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	>8	>32	8	16	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	28	18	28
RS279	>16	>32	32	>8	>16	8	2-16	1	16	≤2	>64	>32	32	4	32	>512	>128	27	17	26
RS280	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	4	>32	8	>64	>32	≤4	1	>64	>512	>128	32	18	32
RS281	>16	>32	32	>8	>16	8	2-16	2	>32	16	64	>32	8	2	>64	>512	>128	27	24	31
RS282	>16	>32	8	>8	>16	>32	2-16	1	4	≤2	≤4	>32	8	2	64	>512	>128	30	5	27
RS283	>16	>32	>32	≤0,5	≤1	>32	2-16	≤0,5	4	≤2	≤4	≤4	≤4	>8	≤0,063	64	≤4	30	19	27
RS284	>16	>32	16	>8	>16	32	2-16	≤0,5	4	≤2	≤4	>32	8	1	32	>512	≤4	27	14	28
RS285	>16	>32	8	>8	>16	32	2-16	≤0,5	8	4	>64	>32	16	1	64	>512	>128	31	19	31
RS286	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	1	8	4	8	≤4	8	4	≤0,063	>512	≤4	29	16	27
RS290	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	8	>32	8	>8	>64	>512	≤4	35	20	32
RS291	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	>8	16	4	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	34	28	34
RS292	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	32	>32	32	8	>64	>512	>128	38	23	32
RS293	>16	>32	>32	>8	>16	8	32	>8	16	≤2	>64	>32	>32	>8	>64	>512	>128	37	26	30
RS294	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	8	>32	8	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	40	28	36
RS299	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	>32	≤2	>64	>32	8	1	8	>512	>128	34	25	32
RS300	>16	>32	4	8	>16	16	2-16	1	4	4	8	>32	16	>8	>64	>512	>128	34	31	34
RS301	>16	>32	4	>8	>16	16	2-16	>8	16	≤2	>64	>32	>32	2	16	>512	>128	36	26	32
RS302	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	≤0,5	4	≤2	64	>32	16	>8	64	>512	>128	29	11	29
RS303	>16	>32	>32	1	≤1	8	2-16	≤0,5	4	≤2	8	≤4	8	>8	≤0,063	128	≤4	25	22	27
RS309	>16	>32	≤2	>8	>16	32	2-16	>8	8	≤2	8	>32	>32	>8	>64	>512	≤4	29	5	25
RS310	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	8	≤2	16	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	25	11	26
RS311	>16	>32	>32	>8	>16	16/32	2-16	≤0,5	4	4	>64	≤4	8	>8	≤0,063	>512	≤4	25	5	24
RS312	>16	>32	>32	>8	>16	4	2-16	1	8	4	>64	16	>32	>8	0,25	>512	>128	26	12	26
RS313	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	1	>32	16	64	>32	8	>8	>64	>512	>128	29	15	27
RS319	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	≤4	>8	32	>512	>128	32	19	31
RS320	>16	>32	4	8	>16	8	2-16	≤0,5	8	4	>64	>32	16	>8	>64	>512	>128	30	25	32
RS321	>16	>32	8	>8	8	≤2	2-16	1	>32	32	32	>32	≤4	1	>64	>512	>128	30	25	33
RS322	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	≤4	>8	>64	>512	>128	30	15	29
RS323	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	>32	≤2	>64	8	8	>8	≤0,063	>512	>128	32	20	31
RS329	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	4	32	16	>64	>32	8	2	64	>512	≤4	30	17	30
RS362	>16	>32	16	>8	>16	>32	>32	2	32	4	8	>32	8	>8	>64	>512	>128	30	14	28
RS363	>16	>32	>32	>8	>16	8	2-16	1	8	4	>64	>32	32	>8	64	>512	>128	26	10	28
RS366	>16	>32	4	>8	>16	>32	>32	>8	>32	>32	>64	>32	32	>8	2	>512	>128	24	5	28
RS367	>16	>32	>32	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	4	≤2	≤4	8	≤4	>8	≤0,063	≤32	≤4	30	25	33
RS368	>16	>32	≤2	>8	>16	>32	2-16	1	8	≤2	16	>32	>32	>8	32	>512	≤4	29	19	32
RS369	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	>32	8	>8	64	>512	>128	25	5	26
RS370	>16	>32	32	>8	>16	8	2-16	≤0,5	4	≤2	16	>32	8	2	0,5	>512	>128	28	5	30
RS371	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	8	16	>32	16	>8	>64	>512	>128	31	5	28
RS373	>16	>32	8	>8	>16	≤2	2-16	≤0,5	8	≤2	8	16	8	2	0,5	>512	≤4	26	5	28
RS393	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	4	>32	8	64	>32	8	>8	>64	>512	>128	27	15	30
RS394	>16	>32	32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	16	8	>32	16	>8	>64	>512	>128	30	5	26

# Anhang II: Minimale Hemmkonzentrationen (MHK)

Tabelle A9: MHK der *K. pneumoniae*-Ausbruchsisolat

Studien-ID	AMP	MEZ	MSU	CTM	CTX	CAZ	COX	GEN	KAN	AMK	STR	NAL	CMP	OTE	CIP	SMZ
229/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
230/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,25	>512
231/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
232/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
233/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
234/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
236/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
237/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
238/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2	>8	16	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
239/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
240/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2	>8	16	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
241/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	4	≤2	>64	≤4	>32	1	≤0,063	>512
242/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	8	>64	≤4	>32	>8	0,25	>512
243/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	≤4	8	>32	>8	0,125	>512
244/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
246/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	4	≤2	>64	≤4	>32	1	≤0,063	>512
247/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
248/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	>32	>8	16	≤2	>64	>32	>32	>8	1	>512
250/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
251/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,25	>512
254/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,25	>512
255/12	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	≤0,5	32	4	>64	32	≤4	>8	4	>512
256/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
257/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	8	≤4	≤4	8	2	0,25	>512
259/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
260/12	>16	>32	>32	>8	>16	8	2	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
261/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	≤4	≤4	8	2	0,25	>512
262/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,25	>512
266/12	>16	>32	16	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	≤4	≤4	≤4	1	0,063	>512
267/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	≤2	>64	8	>32	>8	0,125	>512
268/12	>16	>32	16	>8	>16	8	2	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
269/12	>16	>32	>32	>8	>16	16	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
271/12	>16	>32	>32	>8	>16	8	2	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
272/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	>32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
273/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
274/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	16	≤2	≤4	≤4	8	2	0,125	>512
275/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
276/12	>16	>32	32	>8	>16	32	2-16	1	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
300/12	>16	>32	32	>8	>16	>32	2	>8	32	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
307/12	>16	>32	>32	>8	>16	32	2-16	>8	32	≤2	>64	8	>32	>8	0,125	>512
309/12	>16	>32	32	>8	>16	4	2	>8	16	≤2	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
310/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
315/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	>32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
316/12	>16	>32	≤2	>8	>16	>32	2-16	>8	8	≤2	64	≤4	8	>8	≤0,063	>512
373/12	>16	>32	>32	>8	>16	>32	2-16	>8	32	4	>64	≤4	>32	>8	0,125	>512
392/12	>16	>32	≤2	>8	16	4	2	>8	16	4	64	≤4	>32	>8	≤0,063	>512

## Anhang III: Nukleotidpolymorphismen

Tabelle A10: Nukleotidpolymorphismen (SNPs) der *K. pneumoniae*-Ausbruchs isolate

SNP	Contig	Base	NTUH-K2044	Ursprüngliche Base	Abgeleitete Base	Ursprüngliche Aminosäure	Abgeleitete Aminosäure	Produkt	Gen	Locus Tag
1	ctg7180000000116	458036	1919715	still	c	t	P	methylglyoxal synthase	mgsA	KPN_00992
2	ctg7180000000116	308217	1769796	still	g	a	A	ribosomal protein S12 methylthiotransferase	rimO	KPN_00866
3	ctg7180000000116	115951	1577794	AS-Austausch	c	g	G	glutamate/aspartate ABC superfamily ATP binding cassette transporter		KPHS_15190
4	ctg7180000000116	79727	1541581	still	c	t	L	phosphoglycolate phosphatase		KPN_00644
5	ctg7180000000119	69008	n/a	AS-Austausch	g	a	S	major facilitator family transporter		KPHS_06510
6	ctg7180000000119	92171	760321	AS-Austausch	c	a	L	2-component transcriptional regulator		KPHS_06730
7	ctg7180000000119	129363	797512	AS-Austausch	g	a	M	putative RNA methyltransferase		KPHS_07100
8	ctg7180000000120	68003	4827203	AS-Austausch	a	t	Q	penicillin-binding protein 1a	mrcA	KPN2242_21855
9	ctg7180000000121	130308	382471	intergensisch	a	t		n/a	n/a	n/a
10	ctg7180000000123	203116	1354361	AS-Austausch	t	a	Y	DNA-binding transcriptional activator CadC	cadC	KPN_00498
11	ctg7180000000125	75067	n/a	intergensisch	g	a		n/a		n/a
12	ctg7180000000126	49084	173694	still	g	t	L	hypothetical protein	yigA	KPN_04309
13	ctg7180000000126	76850	201447	AS-Austausch	c	a	G	transcriptional activator RfaH	rfaH	KPN_04336
14	ctg7180000000127	3831	n/a	AS-Austausch	g	a	R	putative UDP-glucose lipid carrier transferase		KPN2242_15565
15	ctg7180000000127	130737	3351488	still	g	t	V	hypothetical protein		KPN_02400
16	ctg7180000000127	59356	3280106	AS-Austausch	t	g	D	PTS system mannose-specific EIIB component	manX	KPK_1960
17	ctg7180000000129	76214	5167332	still	a	t	I	hypothetical protein		KPHS_52320
18	ctg7180000000129	62724	5153723	AS-Austausch	t	a	S	hypothetical protein		KPN_04048
19	ctg7180000000131	105486	4642708	still	c	a	A	putative protease	yhbV	KP1_4874
20	ctg7180000000131	55307	4579768	AS-Austausch	a	t	S	putrescine aminotransferase		KPHS_46340
21	ctg7180000000134	123931	5008720	intergensisch	c	a		n/a		n/a
22	ctg7180000000134	115942	5000731	AS-Austausch	t	a	D	biotin sulfoxide reductase		KPHS_50670
23	ctg7180000000135	21891	2758559	still	a	g	D	oxidoreductase alpha		KP1_2886
24	ctg7180000000135	12936	2749603	AS-Austausch	t	a	E	hypothetical protein		KPHS_27830
25	ctg7180000000138	30410	2924904	still	a	t	R	DNA-binding transcriptional repressor PurR		KPHS_29780
26	ctg7180000000138	36663	2931158	AS-Austausch	g	a	G	multidrug efflux protein	norM	KPN_02001
27	ctg7180000000138	147043	3055244	AS-Austausch	a	t	N	ABC transporter substrate-binding protein		KPHS_31070
28	ctg7180000000138	170529	3078730	AS-Austausch	c	a	D	putative acriflavin resistance efflux protein		KP1_3242
29	ctg7180000000139	57487	2550141	still	a	g	L	putative transport transmembrane protein		KP1_2665
30	ctg7180000000139	31911	2524563	AS-Austausch	c	g	A	putative DEOR-type transcriptional regulator	ygbI	KPN_01606
31	ctg7180000000139	28145	2520798	still	c	t	V	putative aldolase	ygbL	KPN_01603
32	ctg7180000000139	25717	2518370	still	g	a	L	putative ARAC-type regulatory protein		KPN_01600
33	ctg7180000000140	60113	3149715	AS-Austausch	g	a	A	nitrate reductase 1 beta subunit	narH	KP1_3324
34	ctg7180000000143	19238	4453297	intergensisch	c	g		n/a		n/a
35	ctg7180000000144	1179	2338052	AS-Austausch	a	g	C	TetR family transcriptional regulator		KP1_2433
36	ctg7180000000144	35248	2372096	still	c	a	A	tyramine oxidase	tynA	KP1_2469
37	ctg7180000000146	46249	n/a	intergensisch	a	g		n/a		n/a
38	ctg7180000000146	53199	2672301	AS-Austausch	a	t	H	putative transporter		KP1_2801
39	ctg7180000000149	18984	2288360	AS-Austausch	t	c	I	hypothetical protein		KP1_2381
40	ctg7180000000154	899	n/a	still	g	t	I	DNA-binding transcriptional activator GcvA	gcvA	KPK_0958
41	ctg7180000000214	23054	235530	AS-Austausch	t	a	L	DNA-directed RNA polymerase subunit beta	rpoC	KPN_04366
42	ctg7180000000223	11044	4016801	AS-Austausch	g	c	A	hypothetical protein	yfiR	KPN_02924
43	ctg7180000000223	184908	4191515	AS-Austausch	a	g	Q	putative transcriptional regulator		KP1_4369
44	ctg7180000000223	187980	4194587	Stop	g	a	Q	RNA polymerase sigma factor RpoS	rpoS	KPN_03103
45	ctg7180000000223	188073	4194680	AS-Austausch	c	g	A	RNA polymerase sigma factor RpoS	rpoS	KPN_03103
46	ctg7180000000223	226515	4233116	intergensisch	t	a		n/a		n/a
47	ctg7180000000223	337626	4344227	AS-Austausch	c	a	Q	putative racemase	ygeA	KPN_03254
48	ctg7180000000223	379928	4386540	AS-Austausch	g	a	G	fimbrial protein FimH		KPHS_43610
49	ctg7180000000224	156219	1013509	still	c	t	I	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl] glucosamineN-acyltransferase	lpxD	KPN_00192
50	ctg7180000000224	168362	1025652	AS-Austausch	t	a	L	tRNA(Ile)-lysine synthetase	tilS	KP1_1046
51	ctg7180000000226	305413	3876114	intergensisch	g	a		n/a		n/a
52	ctg7180000000226	299354	3870054	Stop	c	t	Q	transaldolase A		KPHS_38680
53	ctg7180000000226	259099	3829798	still	g	t	L	putative cytochrome oxidase	yfeH	KPN_02756
54	ctg7180000000226	107499	3719296	AS-Austausch	c	t	P	sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase largesubunit		KPHS_37130
55	ctg7180000000226	29936	3643180	still	g	a	G	galactose ABC transporter substrate-binding protein	mgIB	KPN_02588
56	ctg7180000000226	10515	3623643	still	a	g	P	D-lactate dehydrogenase	dld	KP1_3796
von phylogenetischen Analysen ausgeschlossen										
57	ctg7180000000119	28881	702240	AS-Austausch	t	a	F	putative regulatory protein MarR		KPN_04761
58	ctg7180000000119	29239	702598	AS-Austausch	g	t	F	putative regulatory protein MarR		KPN_04761
59	ctg7180000000125	43879	1081675	AS-Austausch	a	t	L	hypothetical protein		P1_1108
60	ctg7180000000125	43795	1081590	AS-Austausch	a	t	L	hypothetical protein		P1_1108
61	ctg7180000000123	155004	n/a	intergensisch	c	g		n/a		n/a



## Anhang IV: Coverage-Werte der *K. Pneumoniae*-Genome

**Tabelle A12:** erzielte Coverage-Werte der Resequenzierung der *K. pneumoniae* Ausbruchsisolate

Isolat	Reads (~100bp)	Coverage [x-fach]	Isolat	Reads (~100bp)	Coverage [x-fach]
267/12	1.729.846	33	237/12	16.536.514	312
256/12	13.744.756	259	238/12	3.980.898	75
261/12	1.822.548	34	242/12	17.268.514	326
257/12	19.568.334	369	244/12	20.244.914	382
274/12	2.198.892	41	275/12	2.512.588	47
309/12	3.763.088	71	241/12	16.910.498	319
260/12	9.828.156	185	246/12	4.830.676	91
233/12	2.023.970	38	268/12	7.209.304	136
307/12	5.821.646	110	269/12	5.803.816	110
234/12	3.870.684	73	271/12	3.731.102	70
259/12	7.419.492	140	392/12	16.996.292	321
232/12	5.686.874	107	272/12	13.348.564	252
248/12	4.699.708	89	276/12	3.765.076	71
247/12	20.005.766	377	273/12	22.639.028	427
251/12	8.508.864	161	373/12	3.253.050	61
300/12	8.873.220	167	255/12	7.856.828	148
236/12	2.649.982	50	266/12	2.311.070	44
254/12	15.677.356	296	229/12	2.952.706	56
262/12	3.111.408	59	230/12	2.893.286	55
250/12	30.575.556	577	231/12	4.122.538	78
240/12	4.313.820	81	310/12	5.435.084	103
243/12	22.206.970	419	315/12	6.097.540	115
239/12	6.041.654	114	316/12*	1.369.398	26

Coverage = Anzahl Reads\*durchschnittl. Read-Länge/Genomgröße



## Abkürzungsverzeichnis

AMK	Amikacin
AMP	Ampicillin
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain-Heart-Infusion
bp	Basenpaare
CAZ	Ceftazidim
CIP	Ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMP	Chloramphenicol
COX	Cefoxitin
CSB	Cell Suspension Buffer
CTM	Cefotiam
CTX	Cefotaxim
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTP	Didesoxyribonukleotide
DIG	Dioxigenin
DIN	Deutsche Industrienorm
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	Extended-Spektrum $\beta$ -Laktamase
ESS	Effective Sample Size
ETP	Ertapenem
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	Cefepim
G/C-Gehalt	Guanin/Cytosin-Gehalt
GCG	Gallsäure-Chrysoidin-Glycerol
GEN	Gentamicin
Inc	Inkompatibilitätsgruppe
IPM	Imipenem
IS	Insertionssequenz
KAN	Kanamycin
kb	Kilobasenpaare
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
LB	Luria-Bertani
Mb	Megabasenpaare
MCMC	Markov Chain Monte Carlo
MEZ	Mezlocillin
MGE	Mobiles genetisches Element
MH	Müller-Hinton

---

MHK	Minimale Hemm-Konzentration
ML	Maximum-Likelihood
MLST	Multilocus Sequence Typing
MRGN	Multiresistente Gram-negative
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MST	Minimum Spanning Tree
MSU	Mezlocillin/Sulbactam
NAL	Nalidixinsäure
NRZ	Nationales Referenzzentrum
OTE	Oxytetracyclin
PBP	Penicillin-Bindeprotein
PBRT	PCR-basierten Replikon Typisierung
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsfeld-Gelelektrophorese
pMLST	Plasmid Multilocus Sequence Typing
PMQR	Plasmid-Mediated Quinolone Resistance
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SMRT	Single Molecule Realtime
SMZ	Sulfmerazin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Saline Sodium Citrate
ST	Sequenztyp
STR	Streptomycin
SXT	Sulfmethoxazol/Trimethoprim
T <sub>A</sub>	Annealing-Temperatur
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TMRCa	Time to the Most Recent Common Ancestor
ZMW	Zero Mode Waveguides

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Anteil invasiver <i>E. coli</i> und <i>K. pneumoniae</i> mit Resistenzen gegenüber Drittgenerations-Cephalosporinen in Europa 2012 .....	2
Abbildung 1.2: Hydrolytische Öffnung des Laktam-Rings von $\beta$ -Laktam-Antibiotika durch $\beta$ -Laktamasen .....	5
Abbildung 1.3: Genetische Verwandtschaft der CTX-M-Gruppen auf Basis ihrer Aminosäuresequenz. ....	11
Abbildung 3.1: Geographische Herkunft der Patienten mit ambulanten ESBL- <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborstudie .....	47
Abbildung 3.2: Geographische Herkunft der Patienten mit nosokomialen ESBL- <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborstudie .....	52
Abbildung 3.3: Geographische Herkunft der Patienten der Charité Fall-Kontroll-Studie .....	58
Abbildung 3.4: <i>Xba</i> I Makrorestriktionsmuster von klinischen Isolaten des CTX-M-1- produzierenden <i>Salmonella</i> Typhimurium DT193-Ausbruchsstammes aus 2007 .....	66
Abbildung 3.5: Untersuchung des klinischen <i>Salmonella</i> Paratyphi B-Isolates (75/08); A) <i>Xba</i> I-Makrorestriktionsmuster-Vergleich des klinischen <i>Salmonella</i> Paratyphi B-Isolates (75/08).....	67
Abbildung 3.6: <i>Xba</i> I-Makrorestriktionsanalyse der vier CTX-M-8-bildenden <i>E. coli</i> -Isolate ...	69
Abbildung 3.7: S1-Nuklease-Verdau der Plasmide der CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Stämme. ....	71
Abbildung 3.8: <i>Eco</i> RI-Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-Analyse (RFLP) der <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> -tragenden Plasmide der <i>E. coli</i> K12J53 Transkonjuganten.....	72
Abbildung 3.9: Maximum-Likelihood-Tree basierend auf dem SNP-Alignment der Kerngenome aller ausbruchsassoziierten ST514-Isolate .....	81
Abbildung 3.10: Maximum-Likelihood-Tree (MLT) aller <i>K. pneumoniae</i> -ST514- Ausbruchsisolate basierend auf 56 Kerngenom-SNPs. ....	82
Abbildung 3.11: Minimum-Spanning-Tree (MST) der Ausbruchs-assoziierten <i>K. pneumoniae</i> -Isolate.....	83
Abbildung 3.12: Ergebnisse der BEAST-Berechnung der Zeit bis zum letzten gemeinsamen Vorfahr (TMRCA) mit zufällig auf die Isolate verteilten Isolationsdaten .....	85

Abbildung 4.1: Verteilung der in den <i>E. coli</i> aus dem Limbach-Laborverbund detektierten ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen von <i>E. coli</i> .....	88
Abbildung 4.2: Phylogenetische Gruppen der <i>E. coli</i> aus dem Limbach-Laborverbund mit den zwei häufigsten ESBL CTX-M15 und CTX-M-1 .....	89
Abbildung 4.3: Verteilung der in den ambulanten <i>E. coli</i> aus der Charité Berlin detektierten ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen von <i>E. coli</i> .....	91
Abbildung 4.4: Phylogenetische Gruppen der ambulanten <i>E. coli</i> aus der Charité Berlin mit den zwei häufigsten ESBL CTX-M1 und CTX-M-15 .....	91

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Schema zur Klassifikation von $\beta$ -Laktamasen nach Ambler .....	9
Tabelle 1.2: Schema zur Klassifikation von $\beta$ -Laktamasen nach Bush <i>et al.</i> ....	10
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte und deren Hersteller .....	19
Tabelle 2.2: Eingesetzte Chemikalien und deren Bezugsquelle .....	20
Tabelle 2.3: In MHK-Mikrobouillon verwendete Chemotherapeutika .....	21
Tabelle 2.4: Verwendete Antibiotika-Testplättchen .....	21
Tabelle 2.5: Verwendete Kits .....	22
Tabelle 2.6: Verwendete Nährmedien .....	22
Tabelle 2.7: Verwendete PCR-Primer .....	23
Tabelle 2.8: Verwendete Software und Online-Ressourcen .....	25
Tabelle 2.9: Sequenzierplattformen .....	26
Tabelle 2.10: Einstellungen für Bayes'sche Analyse mit BEAST .....	45
Tabelle 3.1: Altersgruppierung der Patienten mit ambulanten ESBL- <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborstudie .....	47
Tabelle 3.2: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der 105 ambulanten ESBL- <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborstudie .....	49
Tabelle 3.3: Identifizierte ESBL-Typen ambulanter <i>E. coli</i> -Isolate der Limbach-Laborstudie ..	50
Tabelle 3.4: Mit anderen $\beta$ -Laktamasen assoziierte ESBL-Gene in den ambulanten <i>E. coli</i> - Isolaten der Limbach-Laborstudie .....	50
Tabelle 3.5: Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der ambulanten <i>E. coli</i> -Isolate der Limbach-Laborstudie .....	51
Tabelle 3.6: Altersgruppierung der nosokomialen Patienten der Limbach-Laborstudie .....	53
Tabelle 3.7: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der 126 nosokomialen ESBL- <i>E. coli</i> aus der Limbach-Laborstudie .....	54
Tabelle 3.8: Identifizierte ESBL-Typen in nosokomialen <i>E. coli</i> -Isolaten der Limbach Laborstudie .....	55

Tabelle 3.9: Mit anderen $\beta$ -Laktamasen assoziierte <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> -Gene in den nosokomialen Isolaten der Limbach-Laborstudie .....	55
Tabelle 3.10: Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der nosokomialen <i>E. coli</i> -Isolate der Limbach-Laborstudie .....	56
Tabelle 3.11: Altersgruppierung der Patienten der Charité-Fall-Kontroll-Studie .....	57
Tabelle 3.12: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der ambulanten Isolate der Charité-Fall-Kontroll-Studie .....	59
Tabelle 3.13: Identifizierte ESBL-Typen in ambulanten <i>E. coli</i> -Isolaten der Charité-Fall-Kontroll-Studie .....	60
Tabelle 3.14: <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> -assoziierte ESBL-Gene in den Isolaten der Charité-Fall-Kontroll-Studie .....	60
Tabelle 3.15 : Verteilung der verschiedenen ESBL-Typen auf die phylogenetischen Gruppen der <i>E. coli</i> -Isolate in der Charité-Fall-Kontroll-Studie .....	61
Tabelle 3.16: Anzahl in das NRZ eingesandter Salmonellen und Häufigkeit ESBL/AmpC-produzierender Isolate .....	62
Tabelle 3.17: Resistenzraten der <i>Salmonella enterica</i> -Isolate mit Cefotaxim- und/oder Ceftazidim-Resistenz aus der Datenbank des NRZ für Salmonellen .....	63
Tabelle 3.18: Anzahl der ESBL-positiven, monophasischen <i>Salmonella</i> Typhimurium Variante 4,[5],12:i:- aus humanen Infektionen in Deutschland 2005-2011 .....	64
Tabelle 3.19: Anzahl der ESBL und AmpC- $\beta$ -Laktamase-Gene in 150 Cephalosporin-resistenten <i>Salmonella enterica</i> -Isolaten in Deutschland 2005-2011 .....	65
Tabelle 3.20: CTX-M-8-positive Enterobacteriaceae-Isolate (2009-1012) .....	68
Tabelle 3.21: Antibiotikaresistenzen der CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Isolate .....	70
Tabelle 3.22: $\beta$ -Laktamasen und Plasmidcharakteristika der untersuchten CTX-M-8-produzierenden Enterobacteriaceae-Stämme .....	71
Tabelle 3.23: Liste der in epidemiologisch bestätigten Patienten und sequenzierten <i>K. pneumonia</i> -Stämme .....	75
Tabelle 3.24: Ergebnisse der antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung der <i>K. pneumoniae</i> -Ausbruchs isolate .....	77
Tabelle 3.25: Ergebnisse der <i>de novo</i> -Sequenzierung des Isolates 234/12 .....	78

Tabelle 3.26: In den Plasmidsequenzen des Referenzisolates 234/12 gefundene Inkompatibilitätsgruppen-spezifische Gene.....	79
Tabelle 3.27: Plasmidkodierte Antibiotikaresistenz-Determinanten aus dem Assembly der Plasmid- <i>de novo</i> -Sequenzierung des Referenzisolates 234/12 .....	79
Tabelle 3.28: Prophagenregionen im Kerngenom des Referenzisolates (Isolat 234/12) .....	80

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, ohne die die Anfertigung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Danke an:

Prof. Dr. Michael Steinert für die Begleitung des Promotionsverfahrens als Mentor und die Übernahme des Erstgutachtens.

PD Dr. Guido Werner für das Ermöglichen der Durchführung dieser Arbeit, die Förderung sowie die Übernahme des Zweitgutachtens.

Dr. Yvonne Pfeifer für die hervorragende Betreuung, das Interesse am Fortlauf der Arbeit sowie die angenehme und produktive Zusammenarbeit.

PD Dr. Ulrich Nübel für die Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Das gesamte RKI Wernigerode und besonders FG 13 für die freundliche Aufnahme, die entgegengebrachte Hilfe und viele informative, produktive und lustige Tage.

Sibylle Müller-Bertling und Christine Günther für die Unterstützung im Labor und die zahlreichen nette Unterhaltungen.

Matthias Steglich für seine Hilfsbereitschaft und die spannenden Reisen nach Lissabon und Paris.

Dr. Janina Dordel, Dr. Kevin Kurt und Mohamed Abdel Bary für ihre Freundschaft, die Inspiration und die zahllosen lustigen Erlebnisse.

Meine Eltern Ulrike und Peter Eller. Danke für eure immerwährende Unterstützung und euer Verständnis, ohne die ich nie so weit gekommen wäre!



## Lebenslauf

Name: Christoph Eller  
Geburtsdatum: 05. März 1983  
Geburtsort: Halle (Saale)

<b>01/2011-12/2013</b>	<b>Promotion</b> Robert Koch-Institut, FG 13 Nosokomiale Infektionen und Antibiotikaresistenz
<b>05/2009-04/2010</b>	<b>Diplomarbeit</b> Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für molekulare Ökologie
<b>10/2003-04/2010</b>	<b>Studium Biologie</b> Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
<b>10/2002-06/2003</b>	<b>Grundwehrdienst</b> Sanitätsregiment 13 Halle (Saale)
<b>09/1993-06/2002</b>	<b>Allg. Hochschulreife</b> Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium Merseburg

### Sonstige Publikationen:

**Leistner R, Sakellariou C, Gürntke S, Kola A, Steinmetz I, Kohler C, Pfeifer Y, Eller C, Gastmeier P, Schwab F**

*Mortality and molecular epidemiology associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Escherichia coli from bloodstream infection.* Journal of Infection and Drug Resistance. **2014**.13;7:57-62. doi: 10.2147/IDR.S56984.